CSA220996

Organizacion y Digitalizacion CSA Ltda.

1337

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 08-133314

54. **TÍTULO** *PROTEINAS MONOCATENARIAS DE ENLACE MULTIVALENTE CON FUNCION EFECTORA.*

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** *C07K 16/28*

71. **SOLICITANTE** *TRUBION PHARMACEUTICALS, INC. Y WYETH*

DOMICILIO *SEATTLE, WASHINGTON, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA Y MADISON, NEW JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA.*

74. **APODERADO** *DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN*

22. **BOGOTÁ, D. C.,**

613

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-133314- -00000-0000
Fecha: 2008-12-16 14:44:59 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 696

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

12 ene 2009

1 SOLICITUD DE:

[X] Patente de Invención [ ] Patente de Modelo de Utilidad

[X] Capitulo I. [ ] Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)	**Nombre:** TRUBION PHARMACEUTICALS, INC., y Wyeth **Dirección:** 2401 Fourth Avenue, Suite 1050, Seattle, Washington 98121, Estados Unidos de América y 5 Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940, Estados Unidos de América. **Nacionalidad o domicilio:** Seattle, Washington, Estados Unidos de América y Madison, New Jersey, Estados Unidos de América **Lugar de Constitución:** Delaware, Estados Unidos de América. **Teléfono:** **Fax:** **E-mail**	**IDENTIFICACIÓN** C.C. [ ] NIT [ ] C.E. [ ] Otro [ ] **Número**
3 REPRESENTANTE O APODERADO (74)	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D´ALEMAN Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6 Teléfono: 6 181088 Fax: 6350824 E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co	**IDENTIFICACIÓN** C.C. [X] NIT [ ] C.E. [ ] Otro [ ] Número 41.654.882 TP 20824 CSJ
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: **VER HOJA ANEXA** Dirección: Nacionalidad o domicilio:	

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/US2007/071052** Fecha **12 de junio de 2007**

Publicación Internacional No. **WO 2007/146968 A3** Fecha **21 de diciembre de 2007**

6 TITULO (54) **PROTEÍNAS MONOCATENARIAS DE ENLACE MULTIVALENTE CON FUNCIÓN EFECTORA.**

7 Clasificación Internacional (51) C07K 16/28

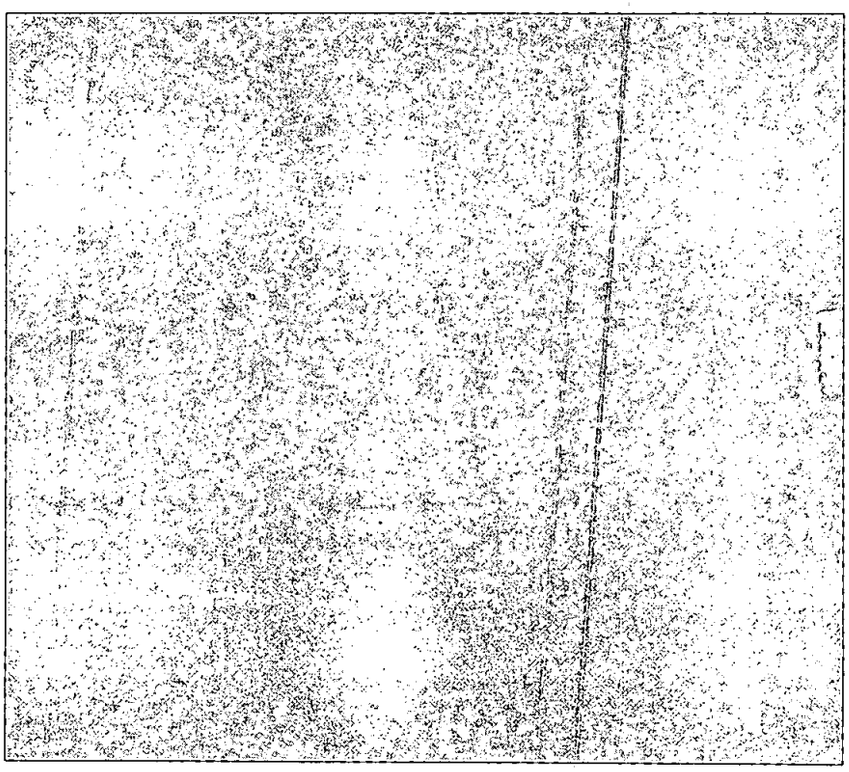
8 Prioridad SI [X] NO [ ]	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	Estados Unidos de América	12 de junio de 2006	60/813.261
	Estados Unidos de América	20 de octubre de 2006	60/853.287

9 Comprobante de pago No. 08 - 96.113 **Fecha** 12 de diciembre de 2008

10 ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- [x] Poderes si fuere el caso TRUBION PHARMACEUTICALS, INC.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- [ ] De ser el caso copia de contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [ ] De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- [ ] Arte final 12 X 12 .
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- [x] Otros * Opinión escrita.

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesion de la patente

NOMBRE : DILIA MARIA RODRIGUEZ D ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 T.P. 20824

As. P-2063

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 96,113
FECHA : DICIEMBRE 12 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-133314- -00000-0000
Fecha: 2008-12-16 14:44:59 Dep: 2020 NUECREACIONE
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 696

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	97803484	11/12/2008	54,925,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL : $	501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

P-2063

ANEXOS

INVENTORES

1.) **THOMPSON, Peter, Armstrong**
(14075 30th Place N.E., Bellevue, Washington 98007, Estados Unidos de América);

2.) **LEDBETTER, Jeffrey, A.**
(18798 Ridgefield Road NW, Shoreline, Washington 98177, Estados Unidos de América);

3.) **HAYDEN-LEDBETTER, Martha, Susan**
(18798 Ridgefield Road NW, Shoreline, Washington 98178, Estados Unidos de América);

4.) **GROSMAIRE, Laura, Sue**
(19909 280th Avenue, SE, Hobart, Washington 98025, Estados Unidos de América);

5.) **BADER, Robert**
(1411 Boylston Avenue, Apt. #314, Seattle, Washington 98122, Estados Unidos de América);

6.) **BRADY, William**
(618 219th Place SW, Bothell, Washington 98021, Estados Unidos de América);

7.) **TCHISTIAKOVA, Lioudmila**
(19 Abbot Bridge Drive, Andover, Massachussetts 01810, Estados Unidos de América);

8.) **FOLLETTIE, Maximillian, T.**
(12 Greenbrook Way, Belmont, Massachussetts 02478, Estados Unidos de América);

9.) **CALABRO, Valerie**
(195 Binney Street #1205, Cambridge, Massachussetts 02142, Estados Unidos de América);

10.) **SCHULER, Alwin**
(2 Centennial Street, Hopedale, Massachussetts 01747, Estados Unidos de América).

1-1185

Washington
Office of the Secretary of State
Invalid if Removed

UNITED STATES OF AMERICA

The State of Washington

Secretary of State

APOSTILLE

(Convention de la Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: **United States of America**

2. This public document has been signed by: RONALD W. SILVERS

3. acting in the capacity of: Notary Public, state of Washington

4. bears the seal/stamp of: RONALD W. SILVERS

CERTIFIED

5. at: Olympia, Washington

6. the: 13 day of May, 2008

7. by: Sam Reed, Secretary of State

8. No: 200806867

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

NOTARIA 35- BOGOTA D.C.
Como Notaria 35 de este Circulo hago constar que esta copia coincide con el documento original presentado para su autenticación
15 DIC 2008
JORGE ALEXANDER CHAPARRO GOMEZ
NOTARIO TREINTA Y SEIS DE BOGOTA
ENCARGADO

Given under my hand and the Seal of the State of Washington at Olympia, the State Capital

Sam Reed

Sam Reed, Secretary of State

Clarke, Modet & C°

COLOMBIA

Carrera 11 n° 86-53, Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 618 1088 Fax: (57 1) 6350824 Email:clarkemodet@clarkemodet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

Trubion Pharmaceutical, Inc

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

Dalaware

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en

2401 4th Avenue Suite 1050, Seattle WA 98121

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones asi como la protección de secretos industriales y know-how.
3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; asi como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los 13 dias de MAYO, 2008

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

legal representative(s) of

Trubion Pharmaceuticals Inc.

an organization existing under the laws of

Delaware

and in present execution of its business activity, domiciled at

2401 4th Ave. Suite 1050, Seattle, WA 98121

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, extensions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.

2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.

3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or extensions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above- mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.

5) To register domain names before the competent entity.
6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.

7) To ratify or not the officious agency.
8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys-in-fact powers to receive notifications and to designate judicial and extra-judicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Granted and signed at

on this 13th day of May

NOTARIA 36- BOGOTA D.C.
Como Notaria 36 de este Círculo hago constar que la firma coincide con el documento original presentado para su autenticación.
15 DIC 2008
JORGE ALEXANDER CHAPARRO GOMEZ
NOTARIO TREINTA Y SEIS DE BOGOTA
ENCARGADO

Firma/Signature

Kathleen McGeeghan Deeley
Sr VP Corporate Counsel
Trubion Pharmaceuticals, Inc.

NOTARIAL CERTIFICATION

State of Washington }
}
County of King }

I certify that I know personally or have satisfactory evidence that Kathleen McKereghan Deeley is the person who appeared before me, and said person acknowledged that she signed this instrument, on oath stated that she was authorized to execute the instrument and acknowledged it as the Senior Vice President, Corporate Counsel of Trubion Pharmaceuticals, Inc., to be the free and voluntary act of such party for the uses and purposes mentioned in the instrument.

Dated: May 13, 2008

Signature: _____

Title: Notary Public for the State of Washington

My Appointment Expires: November 3, 2009

RONALD W. SILVERS
COMMISSION EXPIRES
NOTARY
PUBLIC
11-03-09
STATE OF WASHINGTON

NOTARIA 36- BOGOTA D.C.
Como Notaria 36 de este Circulo hago constar que esta copia coincide con el documento original presentado para su autenticación
15 DIC 2008
JORGE ALEXANDER CHAPARRO GOMEZ
NOTARIO TREINTA Y SEIS DE BOGOTA
ENCARGADO

Traducción oficial de un documento que está originalmente en inglés

CERTIFICADO NOTARIAL

Estado de Washington

Condado de King

Certifico que conozco personalmente o tengo evidencia satisfactoria de que Kathleen McKereghan Deeley es la persona que se presentó ante mí y reconoció haber firmado este instrumento, declaró bajo juramento que ella estaba autorizada para ejecutar el instrumento y lo reconoció como Vicepresidente General y Representante Legal Corporativo de Trubion Pharmaceuticals, Inc. en un acto libre y voluntario para los usos y propósitos mencionados en el instrumento.

Fechado: 13 de mayo de 2008.

(Firmado)

Cargo: Notario Público del Estado de Washington

Mi nombramiento vence el 3 de noviembre de 2009.

Sello: "Ronald W. Silvers – Notario Público del Estado de Washington. Esta comisión vence el día 3 de noviembre de 2009"

Apostilla adjunta:



Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Miniusticia

Washington
Oficina del Secretario de Estado
No es válido si se retira.

Estados Unidos de América
El Estado de Washington
Secretario de Estado
APOSTILLA
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País:	Estados Unidos de América
	El presente documento público
2. Ha sido firmado por:	Ronald W. Silvers
3. Actuando en calidad de:	Notario Público, Estado de Washington
4. Lleva el sello/estampilla de:	Ronald W. Silvers
	Certificado
5. En:	Olimpia, Washington.
6. El:	13 de mayo de 2008.
7. Por:	Sam Reed, Secretario de Estado
8. Bajo el No.:	200806867
9. Sello / estampilla:	Sello del Estado de Washington - 1889
10. Firma:	Dado con mi firma y el Sello del Estado de Washington en Olimpia, la Ciudad Capital. Sam Reed, Secretario de Estado

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto: "Trubion - Cert.N"

Fecha: 3 de junio de 2008.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 No. 99-13 Oficina 411, Bogotá, Colombia

Teléfono: (57-1) 2182308, (57-1) 6232925

E-mail: treseser1@yahoo.com.

Traducción No. 11-204

NOTARIA 36- BOGOTA D.C.
Como Notaria 36 de este Circulo hago constar que esta copia coincide con el documento original presentado para su autenticación
15 DIC 2008

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

PROTEÍNAS MONOCATENARIAS DE ENLACE MULTIVALENTE CON FUNCIÓN EFECTORA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere, en términos generales, al campo de las moléculas de enlace multivalentes y sus aplicaciones terapéuticas.

El listado se secuencias se presenta como un archivo de texto y un archivo PDF independientes, según lo dispuesto por los requisitos establecidos para las presentaciones en formato electrónico. El listado de secuencias se creó el 12 de junio de 2007. El listado de secuencias se incorpora íntegramente a la presente a modo de referencia.

ANTECEDENTES

En los mamíferos sanos, el sistema inmunitario protege al organismo de los daños que producen las sustancias extrañas y los agentes patógenos. Pero, en algunas instancias, el sistema inmunitario se sale de cause, y produce un insulto traumático y/o alguna enfermedad. Por ejemplo, los linfocitos B pueden producir anticuerpos que reconocen las proteínas propias en lugar de las proteínas extrañas, lo que lleva a la producción de auto-anticuerpos característicos de las enfermedades auto-inmunitarias, tales como el lupus eritematoso, artritis reumatoide y demás similares. En otras instancias, el efecto típicamente beneficioso del sistema inmunitario en combinación con los materiales extraños es contraproducente, por ejemplo con posterioridad al transplante de órganos. Se ha reconocido la potencia del sistema inmunitario de los mamíferos y, en particular, del sistema inmunitario de los seres humanos, y se hicieron esfuerzos tendientes a controlar el sistema para evitar o atenuar las consecuencias nocivas para la salud como producto del funcionamiento normal del sistema inmunitario en un entorno anormal (por ejemplo, en caso de transplante de órganos) o bien del funcionamiento anormal del sistema inmunitario en un entorno que en otras circunstancias sería normal (por ejemplo el avance de una enfermedad auto-inmunitaria). Del mismo modo, se hicieron esfuerzos tendientes a explotar el sistema

inmunitario a fin de proporcionar una cantidad de metodologías de tipo diagnóstico y terapéutico con un objetivo específico, dependiendo de la capacidad de los anticuerpos para reconocer específicamente las dianas antigénicas con especificidad, y enlazarse a ellas.

Una forma que tiene el sistema inmunitario de proteger al organismo es mediante la producción de células especializadas, denominadas linfocitos B o células B. Los linfocitos B producen anticuerpos que se enlazan a -y en algunos casos median la destrucción de- una sustancia extraña o agente patógeno. Pero en algunas instancias el sistema inmunitario del ser humano, y específicamente los linfocitos B del sistema inmunitario humano, se salen de cauce y, como consecuencia, se produce una enfermedad. Existen numerosos cánceres que involucran la proliferación incontrolada de los linfocitos B. También existen numerosas enfermedades auto-inmunitarias que implican la producción de anticuerpos por parte los linfocitos B que, en lugar de enlazarse a las sustancias extrañas y los agentes patógenos, se enlazan a partes del organismo. Sumado a ello, existen numerosas enfermedades auto-inmunitarias e inflamatorias en cuya patología se ven implicados los linfocitos B, por ejemplo, a través de la presentación antigénica inapropiada por parte de los linfocitos B a los linfocitos T, o bien a través de otras vías en las que se involucra a los linfocitos B. Por ejemplo, los ratones propensos a enfermedades auto-inmunitarias con deficiencia de linfocitos B no desarrollan enfermedades renales auto-inmunitarias, vasculitis ni auto-anticuerpos. (Shlomchik y colaboradores, *J. Exp. Med.* 1994, 180:1295-306). De manera interesante, estos mismos ratones propensos a las enfermedades auto-inmunitarias que poseen linfocitos B, pero tienen deficiencia en la producción de inmunoglobulina, desarrollan enfermedades auto-inmunitarias cuando se las induce de manera experimental (Chan y colaboradores, *J Exp. Med.* 1999, 189:1639-48), lo cual indica que los linfocitos B juegan un rol integral en el advenimiento de enfermedades auto-inmunitarias.

Los linfocitos B pueden identificarse por las moléculas de su superficie celular. La CD20 fue la primera molécula de superficie de linaje específico de los linfocitos B humanos identificada por un anticuerpo monoclonal. Se trata de una fosfoproteína transmembrana de los linfocitos B de 35 kDa hidrófoba y no glicosilada, que tiene ambos extremos, amino y carboxi, situados dentro de la célula. Einfeld y colaboradores, *EMBO J.* 1988, 7:711-17. La CD20 es expresada por todos los linfocitos B maduros normales, pero no es expresada por los linfocitos B precursores ni las células plasmáticas. No se identificaron los ligandos naturales para la molécula CD20, y la función de CD20 en la biología de los linfocitos B aún no se comprende en su totalidad.

La molécula CD37 es otra molécula de superficie celular de linaje específico de los linfocitos B. La molécula CD37 es una proteína altamente glicosilada de 40 a 52 kDa, que pertenece a la familia de tetraspanina transmembrana de los antígenos de superficie celular. Atraviesa la membrana celular cuatro veces, formando dos bucles extracelulares y exponiendo sus extremos amino y carboxi al citoplasma. La molécula CD37 es altamente expresada en linfocitos B productores de anticuerpos normales (sIg+), pero o se expresa en linfocitos pre-B o células plasmáticas. La expresión de la molécula CD37 en monocitos, granulocitos y linfocitos T en reposo y activados, es baja y no se detecta expresión de CD37 en células NK, plaquetas o eritrocitos. Ver, Belov y colaboradores, *Cancer Res.*, 61(11):4483-4489 (2001); Schwartz-Albiez y colaboradores, *J. Immunol.*, 140(3): 905-914 (1988); y Link y colaboradores, *J. Immunol.*, 137(9): 3013-3018 (1988). Además de los linfocitos B, prácticamente todas las malignidades originadas en linfocitos B son positivas para la expresión de la molécula CD37, incluso CLL, NHL y leucemia de células pilosas (Moore, y colaboradores, 1987; Mérson and Brochier 1988; Faure y colaboradores, 1990). La molécula CD37 participa en la regulación de la función de los linfocitos B, ya que se halló que los ratones carentes de CD37 tienen bajos niveles de IgG1 sérica y presentan disminuida respuesta humoral a los antígenos virales y antígenos modelo. Parece

actuar como una molécula coestimuladora no-clásica o influenciando directamente la presentación antigénica a través de la formación de un complejo con moléculas MHC de clase II. Ver Knobeloch y colaboradores, *Mol. Cell. Biol.*, 20(15):5363-5369 (2000).

Se llevaron a cabo investigaciones y desarrollos de fármacos sobre la base del concepto de que las moléculas de superficie celular de linaje específico de los linfocitos B, tales como CD37 y CD20, pueden ser dianas de los anticuerpos que se enlazarían a -y mediarían la destrucción de- linfocitos B causantes de enfermedades auto-inmunitarias que tienen CD37 y CD20 en sus superficies. Se aplicó a un paciente la denominada "inmunoterapia", que son anticuerpos elaborados (o que se basan en anticuerpos elaborados) en un animal no-humano que se enlazan a las moléculas CD37 ó CD20, para reducir drásticamente los linfocitos B causantes de enfermedades cancerígenas o auto-inmunitarias.

La tecnología de anticuerpos monoclonales y los métodos de ingeniería genética facilitaron el desarrollo de moléculas de inmunoglobulina para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades en seres humanos. La estructura del dominio de las inmunoglobulinas se adapta a las técnicas de ingeniería, dado que los dominios de enlace con el antígeno y los dominios que confieren funciones efectoras pueden intercambiarse entre las clases y subclases de inmunoglobulinas. La estructura y la función de las inmunoglobulinas se analizan, por ejemplo, en Harlow y colaboradores, Eds., *Antibodies: A Laboratory Manual,* capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1988). Se puede hallar una completa introducción al igual que información detallada sobre todos los aspectos de la tecnología de anticuerpos recombinantes en el manual denominado "*Recombinant Antibodies*" (John Wiley & Sons, NY, 1999). Es posible acceder a una recopilación integral de protocolos de laboratorio sobre detalladas técnicas de ingeniería de anticuerpos en R. Kontermann y S. Dübel (eds.), "*The Antibody Engineering Lab Manual*" (Springer Verlag, Heidelberg/New York, 2000).

Una molécula de inmunoglobulina (que se abrevia Ig), es una proteína multimérica, típicamente compuesta de dos polipéptidos de cadena ligera idénticos y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos (H_2L_2), que se unen un complejo macromolecular mediante enlaces disulfuro intercatenarios, es decir, enlaces covalentes entre los grupos sulfidrilo de los residuos cisteína vecinos. Se definen cinco clases de inmunoglobulina humana, según la composición de su cadena pesada, y se denominan IgG, IgM, IgA, IgE e IgD. Los anticuerpos de clase IgG y de clase IgA también se dividen en subclases, denominadas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; e IgA1 e IgA2, respectivamente. Los enlaces disulfuro intercatenarios unen diferentes áreas de la misma cadena polipeptídica, que da como resultado la formación de bucles que, junto con los aminoácidos adyacentes, constituyen los dominios inmunoglobulina. En la porción amino terminal, cada cadena ligera y cada cadena pesada tiene una región variable única que muestra considerable variación en la composición de los aminoácidos entre un anticuerpo y otro. La región variable de la cadena ligera, V_L, tiene un único dominio de enlace con el antígeno y se asocia con la región variable de la cadena pesada, V_H (que también contiene un único dominio de enlace con el antígeno), para formar el sitio de enlace con el antígeno de la inmunoglobulina, el Fv.

Además de las regiones variables, cada una de las cadenas del anticuerpo de longitud completa tiene una región constante que contiene uno o más dominios. Las cadenas ligeras tienen una región constante que contiene un único dominio. De esta manera, las cadenas ligeras tienen un dominio variable y un dominio constante. Las cadenas pesadas tienen una región constante que contiene varios dominios. Las cadenas pesadas en los anticuerpos IgG, IgA e IgD tienen tres dominios, que se designan C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}; y las cadenas pesadas en los anticuerpos IgM e IgE tienen cuatro dominios, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} y C_{H4}. De esta manera, las cadenas pesadas tienen un dominio variable y tres o cuatro dominios constantes. Digna de mención es la organización invariable de estos dominios en todas las especies conocidas, donde las

regiones constantes, que contienen uno o más dominios, se ubican en o cerca del extremo C terminal, tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada de las moléculas de inmunoglobulina, con los dominios variables ubicados hacia el extremo N terminal de las cadenas liviana y pesada. La estructura y la función de las inmunoglobulinas se analizan, por ejemplo, en Harlow y colaboradores, Eds., *Antibodies: A Laboratory Manual,* capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1988).

Las cadenas pesadas de inmunoglobulinas también pueden dividirse en tres regiones funcionales: la región Fd (un fragmento que comprende V_H y C_{H1}, es decir los dos dominios del extremo N terminal de la cadena pesada), la región de bisagra y la región Fc (la región "de fragmento cristalizable"). La región Fc contiene los dominios que interactúan con los receptores de la inmunoglobulina en las células y con los elementos iniciales de la cascada de complementos. En general, la región o fragmento Fc se considera responsable por las funciones efectoras de una inmunoglobulina, tal como la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC, *por su sigla en inglés*), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), y la fijación del complemento, el enlace con los receptores Fc, una mayor semivida *in vivo* respecto de un polipéptido que carece de una región Fc, el enlace con la proteína A y, tal vez, incluso la transferencia placentaria. Capon y colaboradores, *Nature*, 337: 525-531, (1989). Del mismo modo, un polipéptido que contiene una región Fc permite la dimerización/multimerización del polipéptido. Estos términos también se utilizan para las regiones análogas de otras inmunoglobulinas.

Si bien todos los isotipos de inmunoglobulina humana contienen una estructura reconocible en común, cada isotipo exhibe un patrón distinto de función efectora. La IgG, a modo de ejemplo no exhaustivo, neutraliza las toxinas y los virus, opsoniza, fija el complemento (CDC) y participa en la ADCC. La IgM, en cambio, neutraliza los patógenos de transmisión por vía sanguínea y participa en la opsonización. Cuando la

IgA se asocia con su pieza secretora, es secretada y proporciona una defensa primaria contra la infección microbiana a través de la mucosa; también neutraliza las toxinas y apoya la opsonización. La IgE media las respuestas inflamatorias, y tiene una participación central en el reclutamiento de otras células necesarias para montar una respuesta integral. Se sabe que la IgD proporciona una función inmunoreguladora, controlando la activación de los linfocitos B. Estas caracterizaciones de las funciones efectoras del isotipo proporcionan una ilustración no-integral de las diferencias que se pueden encontrar entre los isotipos humanos.

La región de bisagra, encontrada en los anticuerpos de clase IgG, IgA, IgD e IgE, actúa como un separador flexible, que permite que la porción Fab se mueva libremente en el espacio. En contraste a las regiones constantes, los dominios de bisagra son estructuralmente diversos, y varía tanto la secuencia como la longitud entre las clases y subclases de inmunoglobulinas. Por ejemplo, la longitud y flexibilidad de la región de bisagra varía entre las subclases de IgG. La región de bisagra de la IgG1 comprende los aminoácidos 216-231 y, debido a que es libremente flexible, los fragmentos Fab pueden girar alrededor de sus ejes de simetría, y moverse dentro de una esfera centrada en el primero de dos puentes disulfuro dentro de la cadena pesada. La IgG2 tiene una bisagra más corta que la IgG1, con 12 residuos de aminoácidos y cuatro puentes disulfuro. La región de bisagra de la IgG2 carece del residuo glicina, es relativamente corta y contiene una hélice doble de poliprolina rígida, estabilizada por puentes disulfuro dentro de la cadena pesada extra. Estas propiedades restringen la flexibilidad de la molécula IgG2. La IgG 3 se diferencia de las otras subclases por su exclusiva región de bisagra ampliada (alrededor de cuatro veces la longitud de la bisagra IgG1), que contiene 62 aminoácidos (incluso 21 prolinas y 11 cisteínas), que forman una hélice doble de poliprolina inflexible. En la IgG2, los fragmentos Fab están relativamente alejados del fragmento Fc, aportándole mayor flexibilidad a la molécula. La bisagra alargada en la IgG3 también es responsable de su mayor peso molecular, en

comparación con las otras subclases. La región de bisagra de la IgG4 es más corta que la de la IgG1, y su flexibilidad es intermedia entre aquella de la IgG1 y la correspondiente a la IgG2. La flexibilidad de las regiones de bisagra disminuyen en el orden IgG3>IgG1>IgG4>IgG2. Las cuatro subclases de IgG también son diferentes entre sí, respecto de sus funciones efectoras. Esta diferencia se refiere a las diferencias de estructura, incluso diferencias con respecto a la interacción entre la región variable, los fragmentos Fab y el fragmento Fc constante.

Conforme a los estudios cristalográficos, la región de bisagra de la inmunoglobulina también puede dividirse funcionalmente en tres regiones: la región de bisagra superior, la región central y la región de bisagra inferior. Shin y colaboradores, 1992 *Immunological Reviews* 130:87. La región de bisagra superior incluye los aminoácidos desde el extremo carboxilo de C_{H1} al primer residuo en la bisagra que restringe el movimiento, generalmente el primer residuo cisteína que forma un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas. La longitud de la región de bisagra superior se correlaciona con la flexibilidad segmental del anticuerpo. La región de bisagra central contiene los puentes disulfuro dentro de la cadena pesada, y la región de bisagra inferior une el extremo terminal amino del dominio C_{H2} e incluye residuos en C_{H2}. *Ídem.* La región de bisagra central de la IgG1 humana contiene la secuencia Cys-Pro-Pro-Cys que, cuando es dimerizada por la formación de enlace disulfuro, da como resultado un octapéptido cíclico que, según se considera, actúa como un pivote, con lo cual confiere flexibilidad. La región de bisagra también puede contener uno o más sitios de glicosilación, que incluyen una cantidad de estructuralmente diferentes tipos de sitios para la unión de carbohidratos. Por ejemplo, la IgA1 contiene cinco sitios de glicosilación dentro de un segmento de 17 aminoácidos de la región de bisagra, confiriendo resistencia del polipéptido de la región de bisagra a las proteasas intestinales, lo cual se considera una propiedad ventajosa para una inmunoglobulina secretora.

Los cambios conformacionales permitidos por la estructura y flexibilidad de la secuencia polipeptídica de la región de bisagra de la inmunoglobulina también pueden afectar las funciones efectoras de la porción Fc del anticuerpo. Las tres categorías generales de las funciones efectoras asociadas con la región Fc incluyen (1) activación de la cascada de complementos clásicos; (2) interacción con las células efectoras; y (3) compartimentalización de las inmunoglobulinas. Las diferentes subclases de IgG humana varían en cuanto a las eficacias relativas con las cuales fijan el complemento, o activan y amplifican los pasos de la cascada de complementos. Ver, por ejemplo, Kirschfink, 2001 *Immunol. Rev.* 180:177; Chakraborti y colaboradores, 2000 *Cell Signal* 12:607; Kohl y colaboradores, 1999 *Mol. Immunol.* 36:893; Marsh y colaboradores, 1999 *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 8:557; Speth y colaboradores, 1999 *Wien Klin. Wochenschr.* 111:378.

Las excepciones a la estructura H_2L_2 de los anticuerpos convencionales se presentan en algunos isotipos de las inmunoglobulinas encontradas en los camélidos (camellos, dromedarios y llamas; Hamers-Casterman y colaboradores, 1993 *Nature* 363:446; Nguyen y colaboradores, 1998 *J. Mol. Biol* 275:413), los tiburones nodriza (Roux y colaboradores, 1998 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95:11804), y las quimeras americanas (Nguyen, y colaboradores, 2002 *Immunogenetics* 54(1):39-47). Aparentemente, estos anticuerpos forman regiones de enlace con el antígeno que sólo utilizan la región variable de la cadena pesada, es decir, estos anticuerpos funcionales son homodímeros de cadenas pesadas exclusivamente (a las que se hace referencia como "anticuerpos de cadena pesada" o "HCAbs"). Pese a las ventajas de la tecnología de los anticuerpos en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades, existen algunos aspectos desventajosos en el desarrollo de tecnologías de anticuerpos enteros como reactivos para fines diagnósticos y/o terapéuticos. Los anticuerpos enteros son estructuras de proteínas grandes ejemplificadas por la estructura heterotetramérica del isotipo IgG, que contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas

pesadas. Dichas moléculas grandes tienen impedimento estérico en ciertas aplicaciones. Por ejemplo, en los tratamientos de tumores sólidos, los anticuerpos enteros no penetran fácil y rápidamente en el interior del tumor. Más aún, el tamaño relativamente grande de los anticuerpos enteros presenta un desafío para garantizar que la administración *in vivo* de dichas moléculas no induzca una respuesta inmune. Además, la generación de moléculas de anticuerpos activos típicamente implica el cultivo de células eucariotas recombinantes, que tienen la capacidad de proporcionar procesamiento postranslacional adecuado de las moléculas de anticuerpos incipientes, y estas células pueden ser difíciles de someter a cultivo y difíciles de inducir de manera que proporcione resultados comercialmente útiles del anticuerpo activo.

Recientemente, se construyeron moléculas más pequeñas de inmunoglobulina para solucionar los problemas asociados con las metodologías donde se utilizan inmunoglobulinas enteras. Un fragmento de anticuerpo variable monocatenario (scFv) comprende un dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo unido a través de un péptido corto con un dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo (Huston y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85: 5879-83). Debido al reducido tamaño de las moléculas scFv, éstas exhiben una penetración más eficaz en los tejidos que la inmunoglobulina entera. Una molécula scFv anti-tumoral demostró una más rápida penetración tumoral y una distribución más pareja a través de la masa tumoral que el correspondiente anticuerpo quimérico (Yokota y colaboradores, *Cancer Res.* 1992, 52:3402-08).

Pese a las ventajas que aportan las moléculas scFv a la seroterapia, existen varios inconvenientes en este enfoque terapéutico. Un scFv se depura rápidamente de la circulación, lo cual puede reducir los efectos tóxicos en las células normales, pero dicha rápida depuración impide la administración de una dosis mínima eficaz al tejido diana. La elaboración de cantidades adecuadas de scFv para la administración a los pacientes presentó un desafío debido a las dificultades en la expresión y el aislamiento

de la scFv que afectan de manera negativa el rendimiento. Durante la expresión, las moléculas scFv carecen de estabilidad y a menudo se acumulan debido a la asociación de regiones variables de diferentes moléculas. Del mismo modo, los niveles de producción de las moléculas scFv en los sistemas de expresión de mamíferos son bajos, lo cual limita el potencial para la elaboración eficaz de moléculas scFv destinadas al tratamiento terapéutico (Davis y colaboradores, *J Biol. Chem.* 1990, 265:10410-18); (Traunecker y colaboradores, *EMBO J* 1991, 10: 3655-59). Se exploraron las estrategias para mejorar la producción, incluso el agregado de los sitios de glicosilación a las regiones variables (Jost, C. R., patente estadounidense número 5.888.773; Jost y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 1994, 69: 26267-73).

Otra desventaja que presenta el empleo de la terapia con moléculas scFv es la carencia de función efectora. Una molécula scFv sin las funciones citolíticas, tal como la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC, *por su sigla en inglés*), y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, *por su sigla en inglés*), en asociación con la región constante de una inmunoglobulina, puede resultar ineficaz para tratar enfermedades. Aún cuando el desarrollo de la tecnología de scFv empezó hace más de 12 años, actualmente no hay productos scFv aprobados para su empleo en tratamientos terapéuticos.

Como alternativa, se propuso que la fusión de una molécula scFv con otra molécula, tal como una toxina, podría aprovechar la actividad específica de unión al antígeno y el tamaño reducido de una molécula scFv para suministrar la toxina a un tejido diana. Chaudary y colaboradores, *Nature* 1989, 339:394; Batra y colaboradores, *Mol. Cell. Biol.* 1991, 11:2200. La conjugación o fusión de toxinas con las moléculas scFv se ofreció como una estrategia alternativa para proporcionar moléculas potentes y específicas para el antígeno, pero la dosificación con dichos conjugados o quimeras puede verse limitada por una toxicidad excesiva y/o no-específica debido a la fracción de toxina de dichas preparaciones. Los efectos tóxicos pueden incluir la elevación

suprafisiológica de las enzimas hepáticas, el síndrome de derrame vascular y otros efectos no deseados. Sumado a ello, las inmunotoxinas son, en sí mismas, altamente inmunogénicas cuando se administran a un hospedante, y los anticuerpos hospedantes generados contra la inmunotoxina limitan la utilidad potencial para los tratamientos terapéuticos repetidos en un individuo.

La terapia no-quirúrgica del cáncer, tal como la irradiación externa y la quimioterapia, pueden tener eficacia limitada debido a los efectos tóxicos sobre los tejidos y células normales, en razón de la falta de especificidad que exhiben estos tratamientos hacia las células cancerígenas. Para superar esta limitación, se desarrollaron metodologías de tratamiento dirigidas, destinadas a aumentar la especificidad del tratamiento para las células y los tejidos que lo necesitan. Un ejemplo de dicha metodología dirigida para uso *in vivo* es la administración de conjugados de anticuerpos, donde el anticuerpo está diseñado para reconocer específicamente un marcador asociado con una célula o tejido que necesita tratamiento, y el anticuerpo que se conjuga en un agente terapéutico, tal como una toxina, en el caso del tratamiento contra el cáncer. Los anticuerpos, como agentes sistémicos, circulan a compartimientos sensibles e indeseables del cuerpo, tal como la médula ósea. En las lesiones agudas por irradiación, la destrucción de los compartimientos linfoides y hematopoyéticos es un factor fundamental en el desarrollo de septicemia y la posterior muerte. Del mismo modo, los anticuerpos son proteínas grandes y globulares que exhiben escasa penetración en los tejidos que necesitan ser tratados.

Los pacientes humanos y los sujetos no-humanos que sufren de una variedad de procesos de enfermedades en etapa terminal, frecuentemente requieren el transplante de órganos. El transplante de órganos, sin embargo, debe rivalizar con la respuesta inmune adversa del receptor y la protección contra el rechazo inmunológico del órgano trasplantado, deprimiendo la respuesta inmune celular del receptor al órgano extraño con agentes citotóxicos que afectan el linfoide y otras partes del sistema

hematopoyético. La aceptación del injerto se ve limitada por la tolerancia del receptor a estas sustancias químicas citotóxicas, muchas de las cuales son similares a los agentes anticancerígenos (antiproliferativos). Del mismo modo, cuando se utilizan agentes antimicrobianos citotóxicos, particularmente fármacos antivirales, o cuando se utilizan fármacos citotóxicos para el tratamiento de enfermedades auto-inmunitarias, por ejemplo, en el tratamiento del lupus eritematoso sistémico, una limitación grave son los efectos tóxicos de los agentes terapéuticos sobre la médula ósea y las células hematopoyéticas del organismo.

El uso de terapias dirigidas, tal como la terapia conjugada de anticuerpos dirigida, tiene como fin localizar la máxima cantidad posible del agente terapéutico en el sitio de acción, y el éxito de dichas terapias es revelado por la proporción relativamente elevada relación señal a fondo del agente terapéutico. Los ejemplos de anticuerpos dirigidos incluyen conjugados de agentes diagnósticos o terapéuticos de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, péptidos específicos de células o tejidos, y hormonas y otras moléculas de enlace con el receptor. Por ejemplo, los anticuerpos contra diferentes determinantes asociados con las células patológicas y normales, al igual que asociados con microorganismos patógenos, se utilizaron para la detección y el tratamiento de una amplia variedad de afecciones o lesiones patológicas. En estos métodos, el anticuerpo dirigido se conjuga directamente en un agente detector o terapéutico apropiado, que se describe, por ejemplo, en Hansen y colaboradores, patente estadounidense número 3.927.193; y Goldenberg, patentes estadounidenses números 4.331.647, 4.348.376, 4.361.544, 4.468.457, 4.444.744, 4.460.459, 4.460.561, 4.624.846 y 4.818.709.

Un problema encontrado en los métodos de direccionamiento directo, es decir, métodos donde el agente diagnóstico o terapéutico (el "agente activo") se conjuga directamente en la fracción dirigida, es que una fracción relativamente pequeña del conjugado realmente se enlaza con el sitio diana, mientras que la mayoría del

conjugado permanece en circulación y compromete de una u otra manera la función del conjugado dirigido. Para garantizar la máxima ubicación del agente activo, típicamente se administra un exceso del conjugado dirigido, garantizando que parte del conjugado permanecerá sin enlazarse y contribuirá a los niveles de fondo del agente activo. Un conjugado diagnóstico, por ejemplo un conjugado radioinmunoscintográfico o de resonancia magnética que no se enlaza con su diana puede permanecer en circulación, con lo cual aumenta el fondo y disminuye la resolución de la técnica de diagnóstico. En el caso de un conjugado terapéutico que tiene una toxina como agente activo (por ejemplo, un radioisótopo, un fármaco o compuesto tóxico) unido a una fracción dirigida de circulación prolongada, tal como un anticuerpo, el conjugado circulante puede producir una toxicidad inaceptable al hospedante, tal como toxicidad de la médula o efectos colaterales sistémicos.

La patente estadounidense número 4.782.840 revela un método para reducir el efecto de elevados niveles de radiación de fondo durante la cirugía. El método implica inyectar al paciente anticuerpos específicos para el tejido neoplásico, con los anticuerpos marcados con radioisótopos que tengan una semivida adecuadamente larga, tal como yodo-125. Después de la inyección del anticuerpo radiomarcado, cirugía se demora entre 7 y 10 días, como mínimo, con preferencia entre 14 y 21 días, para permitir que el anticuerpo radiomarcado no enlazado se depure a un nivel de fondo bajo.

La patente estadounidense número 4.932.412 revela métodos para reducir o corregir la radiación de fondo no específica durante la detección intraquirúrgica. Los métodos incluyen administrar un agente de contraste, agente de la sustracción o segundo anticuerpo que se enlaza al anticuerpo primario a un paciente que ha recibido un anticuerpo primario radiomarcado.

Además de producir los anticuerpos descriptos anteriormente, el sistema inmunitario incluye una variedad de tipos de células que tienen efectos biológicos

potentes. Durante la hematopoyesis, las células madre derivadas de médula ósea se diferencian en células maduras del sistema inmunitario (linfocitos "B") o bien en los precursores de las células que migran fuera de la médula ósea para madurar en el timo (linfocitos "T").

Los linfocitos B son esenciales para el componente humoral de una respuesta inmunitaria. Los linfocitos B son activadas por una presentación antigénica apropiada para convertirse en células plasmáticas secretoras de anticuerpos; la presentación antigénica también da lugar a la expansión clonal del linfocito B activado. Los linfocitos B son primariamente responsables del componente humoral de una respuesta inmunitaria. Una célula plasmática presenta de manera característica cerca de 10^5 moléculas del anticuerpo (IgD e IgM) en su superficie.

Los linfocitos T pueden dividirse en dos categorías. Los linfocitos "T" citotóxicos, los linfocitos Tc o CTLs (CD8+linfocitos T), matan células que tienen antígeno superficial extraño en asociación con MHC de clase I, y pueden matar células que están hospedando parásitos intracelulares (ya sean bacterias o virus), en la medida en que la célula infectada exhiba un antígeno microbiano en su superficie. Los linfocitos Tc matan las células tumorales y son responsables del rechazo de las células trasplantadas. Los linfocitos Tc reconocen los complejos antígeno-MHC de clase I en las células diana, se ponen en contacto con ellos y liberan el contenido de los gránulos directamente en la membrana de las células diana, que lisa la célula.

Una segunda categoría de linfocitos T es el linfocito T coadyuvante (*helper*) o el linfocito Th (CD4+linfocitos T), que produce linfocinas que son factores "coadyuvantes" en la maduración de los linfocitos B en células de plasma que secretan anticuerpos. Los linfocitos Th también producen ciertas linfocinas que estimulan la diferenciación de linfocitos T efectores y la actividad de los macrófagos. Los linfocitos Th1 reconocen el antígeno en los macrófagos en asociación con MHC de clase II y se activan (por IL-1) para producir linfocinas, incluido el IFN-γ que activa macrófagos y las células NK. Estas

células median varios aspectos de la respuesta inmunitaria mediada por células, incluso las reacciones de hipersensibilidad de tipo retrasado. Los linfocitos Th2 reconocen el antígeno en asociación con MHC de clase II en una célula de presentación antigénica o APC (por ejemplo, macrófagos migratorios y células dendríticas), y luego produce interleuquinas y otras sustancias que estimulan la proliferación y la actividad de los linfocitos B y de los linfocitos T específicos.

Más allá de servir como APC que inician las interacciones, el desarrollo y la proliferación de los linfocitos T, los macrófagos participan en la expresión de la inmunidad medida por células, porque se activan por IFN-γ producido en una respuesta inmune mediada por células. Los macrófagos activados tienen mayor potencial fagocítico y liberan sustancias solubles que causan la inflamación y destruyen muchas bacterias y otras células. Las células asesinas naturales (NK, *por su sigla en inglés*) son células citotóxicas que lisan las células que llevan un antígeno nuevo, independientemente de su tipo de MHC, e incluso lisan algunas células que no tienen proteínas MHC. Los linfocitos T asesinos naturales, o las células NK, son definidos por su capacidad de matar las células que muestran un antígeno extraño (por ejemplo, células tumorales), independientemente del tipo de MHC e independientemente de la sensibilización anterior (exposición) al antígeno. Las células NK pueden ser activadas por IL-2 e IFN-γ, y lisar células de la misma manera que los linfocitos T citotóxicos. Algunas células NK tienen receptores para el dominio Fc del anticuerpo IgG (por ejemplo, CD16 o $F_C\gamma RIII$) y, por lo tanto, pueden enlazarse a la porción Fc de la IgG en la superficie de una célula diana y liberar componentes citolíticos que matan la célula diana a través de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos.

Otro grupo de células son los granulocitos o los leucocitos polimorfonucleares (PMN). Los neutrófilos, un tipo de PMN, matan a los invasores bacterianos y fagocitan los restos. Los eosinófilos son otro tipo de PMN y contienen gránulos que resultan citotóxicos cuando se liberan sobre otra célula, como una célula extraña. Los basófilos,

un tercer tipo de PMN, son mediadores significativos de las respuestas fisiológicas potentes (por ejemplo, inflamación) que ejercen sus efectos al liberar una variedad de compuestos biológicamente activos, como la histamina, la serotonina, las prostaglandinas y los leucotrienos. Común a todos estos tipos de células es la capacidad de ejercer un efecto fisiológico dentro de un organismo, con frecuencia al matar y, optativamente, depurar las composiciones nocivas, tales como las células extrañas.

Si bien una variedad de células mamíferas, incluidas las células del sistema inmunitario, son capaces de ejercer directamente un efecto fisiológico (por ejemplo, la matanza de células, en general mediante Tc, NK, algunos PMN, macrófago y demás), otras células contribuyen indirectamente a un efecto fisiológico. Por ejemplo, la presentación inicial de un antígeno a un linfocito T *naïve* del sistema inmunitario requiere presentación de MHC que ordena el contacto de célula-célula. Aún más, a menudo necesita haber contacto entre un linfocito T activado y un linfocito B específico para el antígeno a fin de obtener una respuesta inmunógena particular. Una tercera forma de contacto célula-célula que se ve a menudo en las respuestas inmunitarias, es el contacto entre un linfocito B activado y células dendríticas foliculares. Cada uno de estos requisitos de contacto de célula-célula complica el direccionamiento de un agente biológicamente activo a una diana dada.

Se considera que la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) es un mecanismo significativo para la depuración de células diana específicas, tales como células tumorales. La CDC es una serie de sucesos que constan de una colección de enzimas que se activan entre sí en forma de cascada. El complemento tiene una función importante para depurar el antígeno, lo cual se logra a través de sus cuatro principales funciones (1) la vasodilatación local; (2) la atracción de las células inmunitarias, especialmente los fagocitos (quimiotaxis); (3) el etiquetado de los microorganismos extraños para la fagocitosis (opsonización); y (4) la destrucción de los

organismos invasores por parte del complejo de ataque a la membrana (MAC, *por su sigla en inglés*). La molécula central es la proteína C3. Es una enzima dividida en dos fragmentos por los componentes de la vía clásica o la vía alternativa. La vía clásica es inducida por los anticuerpos, especialmente la IgG y la IgM, mientras que la vía alternativa es estimulada no-específicamente por los productos bacterianos, tales como el lipopolisacárido (LPS). Brevemente, los productos de la división de la enzima C3 incluyen un péptido pequeño C3a que es quimiotáctico para las células inmunitarias fagocitarias y da como resultado la vasodilatación local causando la liberación del fragmento c5a desde la C5. La otra parte de C3, C3b, recubre los antígenos en la superficie de los organismos extraños y actúa para opsonizar el organismo para la destrucción. La C3b también reacciona con otros componentes del sistema de complementos para formar un MAC que consta de C5b, C6, C7, C8 y C9.

Existen problemas asociados con el uso de anticuerpos en los tratamientos terapéuticos de seres humanos porque la respuesta del sistema inmunitario a cualquier antígeno, aún el más sencillo, es "policlonal," es decir, el sistema fabrica anticuerpos de una gran variedad de estructuras, tanto en las regiones de enlace como en sus regiones efectoras.

Se usaron dos enfoques en un intento de reducir el problema de los anticuerpos inmunogénicos. El primero es la producción de anticuerpos quiméricos en los cuales la parte de enlace con el antígeno (regiones variables) de un anticuerpo monoclonal de ratones se funde a la parte efectora (región constante) de un anticuerpo humano. En un segundo enfoque, los anticuerpos se han alterado mediante una técnica conocida como injerto de la región determinante de la complementariedad (CDR), o "humanización". Este procedimiento fue mejorado a fin de incluir los cambios a los que se hace referencia como "reconstitución" (*reshaping*) (Verhoeyen, y colaboradores, 1988 *Science* 239:1534-1536; Riechmann, y colaboradores, 1988 *Nature* 332:323-337; Tempest, y colaboradores, *Bio/Technol* 1991 9:266-271), "hiperquimerización" (Queen,

y colaboradores, 1989 *Proc Natl Acad Sci USA* 86:10029-10033; Co, y colaboradores, 1991 *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2869 –2873; Co, y colaboradores, 1992 *J Immunol* 148:1149-1154), y "restauración con carillas" (*veneering*) (Mark, y colaboradores, *In*: Metcalf B. W., Dalton B. J., eds. *Cellular adhesion*: *molecular definition to therapeutic potential*. New York: Plenum Press, 1994:291-312).

Un promedio de menos de un anticuerpo terapéutico por año se ha introducido al mercado a partir de 1986, once años después de la publicación de los anticuerpos monoclonales. Cinco anticuerpos monoclonales murinos se introdujeron en la medicina humana durante un período de diez años desde 1986 a 1995, incluidos: "muromonab-CD3" (OrthoClone OKT3®) para el rechazo agudo en caso de trasplantes de órganos; "edrecolomab" (Panorex®) para el cáncer colorrectal; "odulimomab" (Antilfa®) para el rechazo de trasplantes; e "ibritumomab" (*tiuxetan* Zevalin®) para linfoma no-Hodgkin. Además, un fragmento Fab monoclonal, "abciximab" (ReoPro®) se ha comercializado para prevenir la reoclusión de la arteria coronaria. También se lanzaron tres anticuerpos monoclonales quiméricos: "rituximab" (Rituxan®) para tratar los linfomas de linfocitos B; "basiliximab" (Simulect®) para el rechazo de trasplantes; e "infliximab" (Remicade®) para el tratamiento de la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn. Además, el "abciximab" (ReoPro®), un fragmento Fab de 47,6 kD de un anticuerpo monoclonal quimérico humano-murino, se comercializa como un complemento para la intervención coronaria percutánea, para la prevención de las complicaciones isquémicas cardíacas en los pacientes que se someten a intervención coronaria percutánea. Finalmente, se lanzaron siete anticuerpos monoclonales "humanizados". "Daclizumab" (Zenapax®) se usa para prevenir el rechazo agudo de los riñones trasplantados; "palivizumab" (Synagis®) para RSV; "trastuzumab" (Herceptin®) se enlaza al HER-2, un receptor del factor de crecimiento encontrado en las células de cánceres de mama; "gemtuzumab" (Mylotarg®) para la leucemia mieloblástica aguda (AML); "alemtuzumab" (MabCampath®) para la leucemia linfocítica crónica;

"adalimumab" (Humira® (D2E7)) para el tratamiento de la artritis reumatoide; y "omalizumab" (Xolair®), para el tratamiento del asma persistente.

Así, se ha trabajado en una variedad de tecnologías de los anticuerpos para desarrollar y comercializar sustancias terapéuticas y paliativas más eficaces. Lamentablemente, existen problemas que siguen comprometiendo las perspectivas de cada una de estas terapias. Por ejemplo, la mayoría de los pacientes que padecen cáncer tratados con rituximab presentan una recidiva, generalmente dentro de los 6 a 12 meses, aproximadamente, y se informaron reacciones mortales a la infusión dentro de las 24 horas de haberse administrado la infusión de rituximab. La insuficiencia renal aguda que requiere diálisis con instancias de resultados mortales también se informó en el tratamiento con rituximab, y se la identificó con graves reacciones mucocutáneas, algunas de ellas con resultados de muerte. Del mismo modo, se requieren elevadas dosis de rituximab para la inyección intravenosa debido a que la molécula es grande, aproximadamente 150 kDa, y la difusión en los tejidos linfoides donde residen muchas células tumorales es limitada.

La administración de trastuzumab puede dar lugar al desarrollo de disfunción ventricular, insuficiencia cardíaca congestiva y reacciones de hipersensibilidad graves (incluida anafilaxia), reacciones a infusiones y eventos pulmonares. La terapia inmunosupresora con daclizumab entraña un mayor riesgo de desarrollar trastornos linfoproliferativos e infecciones oportunistas. La muerte por insuficiencia hepática, provocada por la hepatotoxicidad grave, y por las enfermedades veno-oclusivas (VOD, *por su sigla en inglés*), se ha informado en pacientes que recibieron gemtuzumab.

También se informó hepatotoxicidad en pacientes que recibían alemtuzumab. Entre los pacientes tratados con alemtuzumab, se registraron casos -que en raras instancias fueron mortales- de pancitopenia/hipoplasia de médula ósea, trombocitopenia idiopática autoinmunitaria y anemia hemolítica autoinmunitaria. El alemtuzumab también puede dar lugar a graves reacciones a infusiones así como las infecciones

oportunistas. En los pacientes tratados con adalimumab, se informaron infecciones graves y septicemia, incluidos casos de muerte, como así también la exacerbación de síntomas clínicos y/o evidencias radiográficas de enfermedades desmielinizantes, y los pacientes tratados con adalimumab en ensayos clínicos tuvieron una incidencia mayor del linfoma que la tasa esperada en la población en general. Supuestamente, el omalizumab induce las neoplasias malignas y anafilaxis.

El término cáncer incluye una gama amplia de enfermedades, que afectan aproximadamente a uno de cada cuatro individuos en todo el mundo. La proliferación rápida y no-regulada de las células malignas es un sello distintivo de muchos tipos del cáncer, incluidas las neoplasias malignas hematológicas. Aunque los pacientes con una afección maligna hematológica se han beneficiado con los adelantos alcanzados en la terapia anticancerígena en los dos últimos decenios (Multani y colaboradores, 1998 *J. Clin. Oncology* 16:3691-3710), y aumentaron los tiempos de remisión, la mayoría de los pacientes todavía recae y sucumbe a su enfermedad. Las barreras para la cura con fármacos citotóxicos incluyen, por ejemplo, la resistencia de células tumorales y la elevada toxicidad de la quimioterapia, lo que impide la dosificación óptima en muchos pacientes.

Se ha informado que el tratamiento de los pacientes con linfoma de linfocitos B de grado bajo o folicular, usando un anticuerpo monoclonal CD20 quimérico induce respuestas parciales o completas en los pacientes. McLaughlin y colaboradores, 1996 *Blood,* 88:90a (abstract, suppl. 1); Maloney y colaboradores, 1997 *Blood,* 90:2188-95. Sin embargo, como se señaló anteriormente, la recaída tumoral ocurre comúnmente dentro de un período de seis meses a un año. Se necesitan otros avances en la seroterapia para inducir respuestas más duraderas, por ejemplo, en el linfoma de linfocitos B de grado bajo, y para permitir el tratamiento eficaz del linfoma de grado alto y otras enfermedades relacionadas con los linfocitos B.

Otro enfoque ha sido dirigir radioisótopos a los linfomas de los linfocitos B usando los anticuerpos monoclonales específicos para CD20. Si bien la eficacia de la terapia supuestamente es mayor, aumenta la toxicidad asociada de la semivida larga *in vivo* del anticuerpo radiactivo, requiriendo a veces que el paciente experimente el rescate de las células madres. Press y colaboradores, 1993 *N. Eng. J. Med.* 329:1219-1224; Kaminski y colaboradores, 1993 *N. Eng.J. Med.* 329:459-65. Los anticuerpos monoclonales contra CD20 también han sido clivados por proteasas para producir fragmentos F(ab')2 o Fab antes de la unión del radioisótopo. Se ha indicado que esto mejora la penetración del conjugado de radioisótopos en el tumor y acorta la semivida *in vivo*, lo cual reduce la toxicidad para los tejidos normales. Sin embargo, estas moléculas carecen de funciones efectoras, incluidas la fijación de complementos y/o ADCC.

Las enfermedades auto-inmunitarias comprenden enfermedades tiroideas auto-inmunitarias, que incluyen la enfermedad de Graves y la tiroiditis de Hashimoto. Sólo en los Estados Unidos, hay cerca de 20 millones de personas que padecen alguna forma de enfermedad tiroidea autoinmunitaria. La enfermedad tiroidea autoinmunitaria es el resultado de la producción de auto-anticuerpos que estimulan la tiroides para provocar el hipertiroidismo (enfermedad de Graves) o destruyen la tiroides para provocar el hipotiroidismo (enfermedad de Hashimoto). La estimulación de la tiroides es provocada por los auto-anticuerpos que enlazan y activan el receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSH, *por su sigla en inglés*). La destrucción de la tiroides es provocada por los auto-anticuerpos que reaccionan con otros antígenos de la tiroides. La terapia actual para la enfermedad de Graves incluye operación quirúrgica, yodo radiactivo o farmacoterapia antitiroidea. El yodo radiactivo se usa ampliamente, ya que los medicamentos antitiroideos tienen fuertes efectos colaterales y es elevada la recurrencia de las enfermedades. Se reserva la cirugía para los pacientes con bocios grandes o donde hay una necesidad de normalizar muy rápidamente la función tiroidea.

No hay ninguna terapia dirigida a la producción de los auto-anticuerpos responsables de la estimulación del receptor de TSH. La terapia actual para la tiroiditis de Hashimoto es la levotiroxina sódica, y se prevé un tratamiento de por vida debido a la baja probabilidad de remisión. Se ha demostrado que la terapia supresiva encoge los bocios en la tiroiditis de Hashimoto, pero no se conocen terapias que reduzcan la producción de auto-anticuerpos para dirigir el mecanismo de las enfermedades.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica caracterizada por la inflamación de las articulaciones, lo cual deriva en hinchazón, dolor y pérdida de la función. Se estima que la AR afecta a 2,5 millones de personas en los Estados Unidos. LA AR es causada por una combinación de los sucesos, incluso una infección o lesión inicial, una respuesta inmunitaria anormal y factores genéticos. Aunque los linfocitos T y los linfocitos B auto-reactivos están presentes en la AR, la detección de altos niveles de anticuerpos que se juntan en las articulaciones, lo que se denomina el factor reumatoide, se usa en el diagnóstico de la AR. La terapia actual para AR incluye muchos medicamentos para controlar el dolor y desacelerar la progresión de la enfermedad. No se ha hallado ninguna terapia que pueda curar la enfermedad. Los medicamentos incluyen fármacos anti-inflamatorios sin esteroides (AINE), y fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad (FARME). Los AINE son útiles en enfermedades benignas, pero no pueden prevenir el avance de la destrucción y el debilitamiento de las articulaciones en casos de AR grave. Tanto los AINE como los FARME se asocian con fuertes efectos colaterales. En diez años, sólo se aprobó un FARME nuevo, la leflunomida. La leflunomida bloquea la producción de auto-anticuerpos, reduce la inflamación y desacelera la progresión de la AR. Sin embargo, este medicamento también causa efectos colaterales graves, en los que se incluyen náuseas, diarrea, pérdida del cabello, erupciones cutáneas y lesiones hepáticas.

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmunitaria causada por recurrentes lesiones de los vasos sanguíneos en varios órganos, incluidos

el riñón, la piel y las articulaciones. Se calcula que el LES afecta a más de 500.000 personas en los Estados Unidos. En pacientes que padecen LES, una interacción defectuosa entre los linfocitos T y los linfocitos B da como resultado la producción de auto-anticuerpos que atacan los núcleos celulares. Estos incluyen anticuerpos bicatenarios anti-ADN y anti-Sm. Los auto-anticuerpos que enlazan los fosfolípidos también se encuentran en cerca de la mitad de pacientes con LES, y son responsables del daño de vasos sanguíneos y de los recuentos sanguíneos bajos. Los complejos inmunes se acumulan en los riñones, los vasos sanguíneos y las articulaciones de los pacientes con LES, donde causan inflamación y daño tisular. No se ha encontrado ningún tratamiento para el LES que cure la enfermedad. Los AINE y los FARME se utilizan para los tratamientos, según la gravedad de la enfermedad. La plasmaféresis con intercambio de plasma para eliminar los auto-anticuerpos puede causar mejoramiento temporal en los pacientes con LES. Existe un acuerdo general de que los auto-anticuerpos son los responsables del LES, por ello las nuevas terapias que producen la depleción del linaje de los linfocitos B, lo cual permite que el sistema inmunitario se restablezca a medida que los precursores generan nuevos linfocitos B, ofrecen esperanza de un beneficio duradero a los enfermos de LES.

El síndrome de Sjögren es una enfermedad auto-inmunitaria caracterizada por la destrucción de las glándulas productoras de la humedad corporal. Se trata de uno de los trastornos auto-inmunitarias que tiene más prevalencia, y se estima que en los Estados Unidos hay 4 millones de afectados. Cerca de la mitad de las personas afectadas por el síndrome de Sjogren también tienen una enfermedad del tejido conectivo, como AR, mientras que la otra mitad tiene el síndrome de Sjogren primario sin otra enfermedad autoinmunitaria concurrente. Los auto-anticuerpos, incluidos los anticuerpos antinucleares, el factor reumatoide, anti-fodrina y el receptor antimuscarínico a menudo están presentes en los pacientes con síndrome de Sjogren.

La terapia convencional incluye corticosteroides, y serían de beneficio contar con terapias adicionales más eficaces.

La púrpura trombocitopénica inmunitaria (PTI) es causada por auto-anticuerpos que se enlazan a las plaquetas de la sangre y causan su destrucción. Algunos casos de PTI son causados por fármacos, y otros se asocian con infección, embarazo o una enfermedad autoinmunitaria como el LES. Cerca de la mitad de todos los casos se clasifican como de origen idiopático. El tratamiento de la PTI es determinado por la gravedad de los síntomas. En algunas situaciones no se necesita ninguna terapia, aunque en la mayoría de los casos se proporcionan medicamentos inmunosupresores, incluidos los corticosteroides o las infusiones intravenosas de la inmunoglobulina, para deplecionar los linfocitos T. Otro tratamiento que generalmente da lugar al aumento del número de plaquetas es la remoción del bazo, el órgano que destruye las plaquetas recubiertas por anticuerpos. Para los pacientes con casos graves se usan fármacos inmunosupresores más potentes, incluida la ciclosporina, la ciclofosfamida o la azatioprina. La remoción de los auto-anticuerpos haciendo atravesar el plasma de los por una columna de proteína A se usa como un tratamiento de segunda línea en los pacientes con estado grave de la enfermedad. Es preciso contar con terapias más eficaces.

La esclerosis múltiple (EM) es, también, una enfermedad autoinmunitaria. Se caracteriza por la inflamación del sistema nervioso central y la destrucción de la mielina, lo cual aísla las fibras de las células nerviosas en el cerebro, la médula espinal y el organismo. Si bien se desconoce la causa de la EM, se cree ampliamente que los linfocitos T auto-inmunitarias hacen una contribución fundamental a la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, en el fluido cerebroespinal de los pacientes con EM están presentes elevados niveles de anticuerpos, y algunas teorías predicen que la respuesta de los linfocitos B que lleva a la producción de anticuerpos es importante para mediar la enfermedad. Ninguna terapia de depleción de linfocitos B se ha estudiado en los

pacientes con MS, y se trata de una enfermedad incurable. El tratamiento que se aplica actualmente es la administración de corticosteroides, que puede reducir la duración y la gravedad de los ataques, pero no afectan el curso de la MS a lo largo del tiempo. Recientemente, se aprobaron nuevas terapias para la MS con interferón (IFN), pero se requieren terapias adicionales más eficaces.

La miastenia grave (MG) es un trastorno neuromuscular autoinmune crónico caracterizado por la debilidad de los grupos musculares voluntarios. La MG afecta a cerca de 40.000 personas en los Estados Unidos. La MG es causada por los auto-anticuerpos que se enlazan a los receptores de acetilcolina expresados en los empalmes neuromusculares. Los auto-anticuerpos reducen o bloquean los receptores de acetilcolina, impidiendo la transmisión de las señales desde los nervios a los músculos. No se conoce cura para la MG. Los tratamientos comunes incluyen inmunosupresión con corticosteroides, ciclosporina, ciclofosfamida o azatioprina. La remoción quirúrgica del timo a menudo se usa para suavizar la respuesta autoinmunitaria. La plasmaféresis, usada para reducir los niveles de auto-anticuerpo en la sangre, es eficaz para la MG, pero es de vida corta porque sigue la producción de los auto-anticuerpos. La plasmaféresis se reserva generalmente para la debilidad muscular grave antes de la operación quirúrgica. Sería beneficioso contar con terapias nuevas y eficaces.

La psoriasis afecta a aproximadamente cinco millones de personas y se caracteriza por la inflamación autoinmunitaria en la piel. La psoriasis también se asocia con la artritis en un 30% (artritis psoriásica). Se han aplicado muchos tratamientos, incluidos los esteroides, los retinoideos de luz ultravioleta, los derivados de vitamina D, la ciclosporina y el metotrexato, pero es también claro que sería conveniente para la psoriasis desarrollar terapias nuevas y eficaces. La esclerodermia es una enfermedad autoinmunitaria crónica del tejido conjuntivo que también se conoce como esclerosis sistémica. La esclerodermia se caracteriza por una sobreproducción del colágeno,

dando lugar a un engrosamiento de la piel, y aproximadamente 300.000 personas en los Estados Unidos la padecen; y en este caso también sería provechoso contar con terapias nuevas y eficaces.

A partir de la explicación previa se entiende que existe la necesidad de contar con composiciones y métodos mejorados para tratar, aliviar o prevenir una variedad de enfermedades, trastornos y afecciones, incluso el cáncer y las enfermedades auto-inmunitarias.

RESEÑA

La invención satisface al menos una de las necesidades ya mencionadas en el arte, porque proporciona proteínas que contienen al menos dos dominios de enlace específicos, donde esos dos dominios están enlazados por una subregión constante derivada de una molécula de anticuerpo unida al por su extremo C terminal a un ligador, al que aquí se hace referencia como ligador de escorpión, y los ácidos nucleicos que codifican tales proteínas, así como la producción, el diagnóstico y los usos terapéuticos de tales proteínas y ácidos nucleicos. La subregión constante comprende un dominio derivado de un dominio de inmunoglobulina CH_2 y, preferentemente, un dominio derivado de un dominio de inmunoglobulina CH_3, pero no contiene un dominio o región que derive de -o corresponda a- un dominio de inmunoglobulina CH_1. Anteriormente, se había pensado que la colocación de una región constante derivada de un anticuerpo en el interior de una proteína interferiría con la función del anticuerpo, tal como la función efectora, por analogía a la colocación convencional de regiones constantes de los anticuerpos en los extremos terminales carboxi de las cadenas de los anticuerpos. Además, la colocación de un ligador de escorpión, que puede ser un péptido de inmunoglobulina similar a bisagra, en el extremo C terminal respecto de una subregión constante es una organización que difiere de la organización de las inmunoglobulinas naturales. La colocación de una subregión constante (con un ligador de escorpión

unido por el extremo C terminal a la región constante) en el interior de un polipéptido o cadena proteica en conformidad con la invención, sin embargo, dio lugar a las proteínas que presentaban la función efectora y las capacidades de enlace multivalente (mono- o multiespecífico) relativamente libres de impedimentos estéricos. Tal como apreciarán los expertos en el arte cuando analicen esta revelación, dichas proteínas tienen diseño modular y pueden construirse de la siguiente manera: seleccionar cualquiera de una variedad de dominios de enlace para el dominio de enlace 1 o el dominio de enlace 2 (o para cualesquier dominios de enlace adicionales que se encuentran en una proteína en particular, según la invención); seleccionar una subregión constante que tenga función efectora; y seleccionar un ligador de escorpión, de tipo similar a bisagra o no-similar a bisagra (por ejemplo, péptidos de la región de tallo receptora de C-lectina de tipo II), donde la proteína exhibe una organización general del dominio de enlace N-dominio de enlace 1-subregión constante-ligador de escorpión-dominio de enlace 2-C. Los expertos en el arte también apreciarán que las proteínas de tal estructura, y los ácidos nucleicos que codifican esas proteínas, encontrarán una variedad amplia de aplicaciones, incluidas las aplicaciones médicas y veterinarias.

Un aspecto de la invención se refiere a una proteína de enlace monocatenaria multivalente con función efectora, o escorpión (los términos se usan de manera intercambiable), que comprende un primer dominio de enlace derivado de una molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo) o una molécula similar a inmunoglobulina, una subregión constante que proporciona función efectora, la subregión constante ubicada en el extremo C terminal del primer dominio de enlace; un ligador de escorpión ubicado en el extremo C terminal de la subregión constante; y un segundo dominio de enlace derivado de una molécula de inmunoglobulina (tal como un anticuerpo), o molécula similar a inmunoglobulina, que se ubica en el extremo C terminal de la subregión constante; con lo cual se ubica la subregión constante entre el primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace. La proteína de enlace

monocatenaria puede ser multiespecífica, por ejemplo biespecífica, porque puede enlazar dos o más dianas diferentes; o bien puede ser no-específica, con dos sitios de enlace para la misma diana. Más aún, todos los dominios de la proteína se encuentran en una única cadena, pero la proteína puede formar homo-multímeros, por ejemplo mediante la formación de enlaces disulfuros intercatenarios. En algunas formas de realización, el primer dominio de enlace y/o el segundo dominio de enlace deriva/n de regiones variables de cadenas de inmunoglobulina ligera y pesada de las mismas o diferentes inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos). La o las inmunoglobulinas pueden ser de cualquier vertebrado, como un mamífero, incluido un ser humano, y pueden ser quiméricas, humanizadas, fragmentos, variantes o derivados de inmunoglobulinas naturales.

La invención contempla las proteínas en las cuales los dominios de enlace primero y segundo se derivan de las mismas o diferentes inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), y donde los dominios de enlace primero y segundo reconocen las mismas o diferentes las dianas moleculares (por ejemplo, marcadores de superficie celular, tal como proteínas unidas por membrana). Aún más, los dominios de enlace primero y segundo pueden reconocer el mismo, o diferentes, epítopos. Las dianas moleculares primera y segunda pueden asociarse con las células, virus, portadores y/u objetos diana primero y segundo. En las formas de realización preferidas según este aspecto de la invención, cada uno del primer dominio de enlace, el segundo dominio de enlace y la subregión constante, deriva de una inmunoglobulina humana, tal como un anticuerpo IgG. Aún en otras formas de realización, la proteína de enlace multivalente con función efectora tiene, al menos, el primer dominio de enlace o el segundo dominio de enlace que reconoce, al menos, una diana molecular acelular, por ejemplo una proteína no-asociada con una célula, como es el caso de una proteína depositada o una proteína soluble. Las dianas moléculas acelulares incluyen, por ejemplo, proteínas que nunca se asociaron con una célula, como es el caso de compuestos administrados tales

como proteínas, al igual que proteínas secretadas, clivadas, presentes en exosomas o bien descargadas o separadas de una célula de alguna otra manera.

Las moléculas diana reconocidas por los dominios de enlace primero y segundo pueden encontrarse en -o asociadas con- iguales o diferentes células procariotas, células eucariotas, virus (incluso los bacteriófagos), portadores de moléculas diana orgánicos o inorgánicos y objetos extraños. Del mismo modo, estas moléculas diana pueden estar en células, virus, portadores u objetos físicamente distintos del mismo tipo (por ejemplo, dos células eucariotas, células procariotas, virus o portadores distintos), o bien aquellas moléculas diana pueden estar en células, virus, portadores u objetos de tipo diferente (por ejemplo, una célula eucariota y un virus). Las células diana son aquellas células asociadas con una molécula diana reconocida por un dominio de enlace, e incluyen células endógenas o autólogas, al igual que células exógenas o extrañas (por ejemplo, células microbianas infecciosas, células de mamíferos transplantados que incluyen glóbulos de sangre transfundida). La invención comprende dianas para los dominios de enlace primero y/o segundo que se encuentran en la superficie de células diana asociadas con una enfermedad, trastorno o afección de un mamífero, tal como un ser humano. Las células diana de ejemplo incluyen una célula cancerígena, una célula asociada con una enfermedad o un trastorno autoinmune, y una célula infecciosa (por ejemplo, una bacteria infecciosa). También se contempla como célula diana una célula de un organismo infeccioso, tal como un parásito de mamífero. En algunas formas de realización, una proteína de la invención es una proteína de enlace multivalente (por ejemplo, multiespecífica) con función efectora, donde al menos uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace reconoce una diana seleccionada del grupo que consta de un antígeno tumoral, una diana de los linfocitos B, un miembro de la superfamilia del receptor TNF, un miembro de la familia Hedgehog, una tirosina quinasa receptora, una molécula relacionada con proteoglicano, un miembro de la superfamilia TGF-beta, una molécula relacionada con

Wnt, un ligando receptor, una diana de los linfocitos T, una diana de células dendríticas, una diana de células NK, una diana de células monocíticas/macrófagas y una diana de la angiogénesis.

En algunas formas de realización de la proteína descripta, el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consta de: antígeno de carcinoma escamocelular 1 (SCCA-1); (T4-A proteico), antígeno de carcinoma escamocelular 2 (SCCA-2); antígeno de carcinoma ovárico CA125 (1A1-3B) (KIAA0049); mucina 1 (mucina asociada a tumores), (mucina asociada a carcinomas), (mucina polimorfa epitelial), (PEM), (PEMT), (episialina); antígeno de la membrana epitelial asociada a tumores, (EMA), (H23AG); mucina urinaria reactiva de maní (PUM); antígeno asociado al carcinoma de mama DF3, antígeno tumoral de linfomas de células T cutáneos (CTCL) se1-1 , antígeno tumoral de CTCL se14-3, antígeno tumoral de CTCL se20-4 , antígeno tumoral de CTCL se20-9, antígeno tumoral de CTCL se33-1, antígeno tumoral de CTCL se37-2, antígeno tumoral de CTCL , se57-1, antígeno tumoral de CTCL se89-1, antígeno de la membrana específico de la próstata, glucoproteína oncofetal trofoblasto 5T4; herpesvirus asociado con el sarcoma de Kaposi Orf73 , MAGE-C1 (antígeno de cáncer/testículo CT7), antígeno MAGE-B1 (antígeno MAGE-XP) (DAM10), antígeno MAGE-B2 (DAM6), antígeno MAGE-2, antígeno MAGE-4a, antígeno MAGE- 4b, antígeno del cáncer de colon NY-CO-45 , antígeno del cáncer del pulmón NY-LU-12 variante A, antígeno de superficie asociado al cáncer, antígeno del adenocarcinoma ART1, antígeno del cáncer de cerebro-testículo paraneoplásico (antígeno onconeuronal MA2; antígeno neuronal paraneoplásico), antígeno ventral neurooncológico 2 (NOVA2), gen del antígeno de carcinoma hepatocelular 520, antígeno asociado a tumor CO-029, antígeno asociado a tumor MAGE-X2, sarcoma sinovial, punto de ruptura X 2 [*X breakpoint 2*], antígeno de carcinoma escamocelular reconocido por linfocitos T, antígeno del cáncer de colon definido serológicamente 1, antígeno del cáncer de mama definido serológicamente NY-BR-15 , antígeno del cáncer de mama definido

serológicamente NY-BR-16, cromogranina A; proteína secretora paratiroidea 1, DUPAN-2, CA 19-9, CA 72-4, CA 195 y L6.

Las formas de realización del método descripto previamente comprenden una diana de los linfocitos B, que se selecciona del grupo que consta de CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD38, CD39, CD40, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD78, CD79a/b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD89, CD98, CD126, CD127, CDw130, CD138 y CDw150.

En otras formas de realización del método que se describió, el miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral se selecciona del grupo que consta de 4-1BB/TNFRSF9, NGF R/TNFRSF16, BAFF R/TNFRSF13C, osteoprotegerina/TNFRSF11B, BCMA/TNFRSF17, OX40/TNFRSF4, CD27/TNFRSF7, RANK/TNFRSF11A, CD30/TNFRSF8, RELT/TNFRSF19L, CD40/TNFRSF5, TACI/TNFRSF13B, DcR3/TNFRSF6B, TNF RI/TNFRSF1A, DcTRAIL R1/TNFRSF23, TNF RII/TNFRSF1B, DcTRAIL R2/TNFRSF22, TRAIL R1/TNFRSF10A, DR3/TNFRSF25, TRAIL R2/TNFRSF10B, DR6/TNFRSF21, TRAIL R3/TNFRSF10C, EDAR, TRAIL R4/TNFRSF10D, Fas/TNFRSF6, TROY/TNFRSF19, GITR/TNFRSF18, TWEAK R/TNFRSF12, HVEM/TNFRSF14, XEDAR, linfotoxina beta R/TNFRSF3, ligando 4-1BB /TNFSF9, linfotoxina, APRIL/TNFSF13, linfotoxina beta/TNFSF3, BAFF/TNFSF13C, ligando OX40/TNFSF4, ligando CD27/TNFSF7, TL1A/TNFSF15, ligando CD30/TNFSF8, TNF-alfa/TNFSF1A, ligando CD40/TNFSF5, TNF-beta/TNFSF1B, EDA-A2, TRAIL/TNFSF10, ligando Fas/TNFSF6, TRANCE/TNFSF11, ligando GITR/TNFSF18, TWEAK/TNFSF12 y LIGHT/TNFSF14.

El método que se describió también incluye formas de realización donde el miembro de la familia Hedgehog se selecciona del grupo que consta de proteínas patched y smoothened. Aún en otras formas de realización, la molécula relacionada a proteoglicano se selecciona del grupo que consta de proteoglicanos y sus reguladores.

Otras formas de realización del método se orientan a procedimientos en los cuales la tirosina quinasa receptora se selecciona del grupo que consta de Axl, FGF R4, C1q R1/CD93, FGF R5, DDR1, Flt-3, DDR2, HGF R, Dtk, IGF-I R, EGF R, IGF-II R, Eph, INSRR, EphA1, insulina R/CD220, EphA2, M-CSF R, EphA3, Mer, EphA4, MSP R/Ron, EphA5, MuSK, EphA6, PDGF R alfa, EphA7, PDGF R beta, EphA8, Ret, EphB1, ROR1, EphB2, ROR2, EphB3, SCF R/c-kit, EphB4, Tie-1, EphB6, Tie-2, ErbB2, TrkA, ErbB3, TrkB, ErbB4, TrkC, FGF R1, VEGF R1/Flt-1, FGF R2, VEGF R2/Flk-1, FGF R3 y VEGF R3/Flt-4.

En otras formas de realización del método, el miembro de la superfamilia de factores transformadores del crecimiento beta (TGF)-beta, se selecciona del grupo que consta de activina RIA/ALK-2, GFR alfa-1, activina RIB/ALK-4, GFR alfa-2, activina RIIA, GFR alfa-3, activina RIIB, GFR alfa-4, ALK-1, MIS RII, ALK-7, Ret, BMPR-IA/ALK-3, TGF-beta RI/ALK-5, BMPR-IB/ALK-6, TGF-beta RII, BMPR-II, TGF-beta RIIb, endoglina/CD105 y TGF-beta RIII.

También otras formas de realización del método comprenden una molécula relacionada a Wnt, que se selecciona del grupo que consta de Frizzled-1, Frizzled-8, Frizzled-2, Frizzled-9, Frizzled-3, sFRP-1, Frizzled-4, sFRP-2, Frizzled-5, sFRP-3, Frizzled-6, sFRP-4, Frizzled-7, MFRP, LRP 5, LRP 6, Wnt-1, Wnt-8a, Wnt-3a, Wnt-10b, Wnt-4, Wnt-11, Wnt-5a, Wnt-9a y Wnt-7a.

En otras formas de realización del método, el ligando del receptor se selecciona del grupo que consta de ligando 4-1BB/TNFSF9, linfotoxina, APRIL/TNFSF13, linfotoxina beta/TNFSF3, BAFF/TNFSF13C, ligando OX40/TNFSF4, ligando CD27/TNFSF7, TL1A/TNFSF15, ligando CD30/TNFSF8, TNF-alfa/TNFSF1A, ligando CD40/TNFSF5, TNF-beta/TNFSF1B, EDA-A2, TRAIL/TNFSF10, ligando Fas/TNFSF6, TRANCE/TNFSF11, ligando GITR/TNFSF18, TWEAK/TNFSF12, LIGHT/TNFSF14, anfiregulina, NRG1 isoforma GGF2, betacelulina, isoforma NRG1 SMDF, EGF, NRG1-alfa/HRG1-alfa, Epigen, NRG1-beta 1/HRG1-beta 1, epiregulina, TGF-alfa, HB-EGF,

TMEFF1/tomoregulina-1, neuregulina-3, TMEFF2, IGF-I, IGF-II, insulina, activina A, activina B, activina AB, activina C, BMP-2, BMP-7, BMP-3, BMP-8, BMP-3b/GDF-10, BMP-9, BMP-4, BMP-15, BMP-5, decapentapléjico, BMP-6, GDF-1, GDF-8, GDF-3, GDF-9, GDF-5, GDF-11, GDF-6, GDF-15, GDF-7, artemina, neurturina, GDNF, persefina, TGF-beta, TGF-beta 2, TGF-beta 1, TGF-beta 3, LAP (TGF-beta 1), TGF-beta 5, TGF-beta latente 1, TGF-beta latente bp1, TGF-beta 1.2, Lefty, Nodal, MIS/AMH, FGF ácido, FGF-12, FGF básico, FGF-13, FGF-3, FGF-16, FGF-4, FGF-17, FGF-5, FGF-19, FGF-6, FGF-20, FGF-8, FGF-21, FGF-9, FGF-23, FGF-10, KGF/FGF-7, FGF-11, neuropilina-1, PlGF, neuropilina-2, PlGF-2, PDGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-B, VEGF-B, PDGF-C, VEGF-C, PDGF-D, VEGF-D y PDGF-AB.

Aún en otra forma de realización, la diana de los linfocitos T se selecciona del grupo que consta de 2B4/SLAMF4, IL-2 R alfa, 4-1BB/TNFRSF9, IL-2 R beta, ALCAM, B7-1/CD80, IL-4 R, B7-H3, BLAME/SLAMF8, BTLA, IL-6 R, CCR3, IL-7 R alfa, CCR4, CXCR1/IL-8 RA, CCR5, CCR6, IL-10 R alfa, CCR7, IL-10 R beta, CCR8, IL-12 R beta 1, CCR9, IL-12 R beta 2, CD2, IL-13 R alfa 1, IL-13, CD3, CD4, ILT2/CD85j, ILT3/CD85k, ILT4/CD85d, ILT5/CD85a, integrina alfa 4/CD49d, CD5, integrina alfa E/CD103, CD6, integrina alfa M/CD11b, CD8, integrina alfa X/CD11c, integrina beta 2/CD18, KIR/CD158, CD27/TNFRSF7, KIR2DL1, CD28, KIR2DL3, CD30/TNFRSF8, KIR2DL4/CD158d, CD31/PECAM-1, KIR2DS4, CD40 ligando/TNFSF5, LAG-3, CD43, LAIR1, CD45, LAIR2, CD83, leucotrieno B4 R1, CD84/SLAMF5, NCAM-L1, CD94, NKG2A, CD97, NKG2C, CD229/SLAMF3, NKG2D, CD2F-10/SLAMF9, NT-4, CD69, NTB-A/SLAMF6, cadena gamma común/IL-2 R gamma, osteopontina, CRACC/SLAMF7, PD-1, CRTAM, PSGL-1, CTLA-4, RANK/TNFRSF11A, CX3CR1, CX3CL1, L-selectina, CXCR3, SIRP beta 1, CXCR4, SLAM, CXCR6, TCCR/WSX-1, DNAM-1, timopoyetina, EMMPRIN/CD147, TIM-1, EphB6, TIM-2, Fas/TNFRSF6, TIM-3, ligando Fas/TNFSF6, TIM-4, Fc gamma RIII/CD16, TIM-6, GITR/TNFRSF18, TNF RI/TNFRSF1A, granulisina, TNF RII/TNFRSF1B, HVEM/TNFRSF14, TRAIL

R1/TNFRSF10A, ICAM-1/CD54, TRAIL R2/TNFRSF10B, ICAM-2/CD102, TRAIL R3/TNFRSF10C, IFN-gamma R1, TRAIL R4/TNFRSF10D, IFN-gamma R2, TSLP, IL-1 RI y TSLP R.

En otras formas de realización, el receptor de células NK se selecciona del grupo que consta de 2B4/SLAMF4, KIR2DS4, CD155/PVR, KIR3DL1, CD94, LMIR1/CD300A, CD69, LMIR2/CD300c, CRACC/SLAMF7, LMIR3/CD300LF, DNAM-1, LMIR5/CD300LB, Fc épsilon RII, LMIR6/CD300LE, Fc gamma RI/CD64, MICA, Fc gamma RIIB/CD32b, MICB, Fc gamma RIIC/CD32c, MULT-1, Fc gamma RIIA/CD32a, nectina-2/CD112, Fc gamma RIII/CD16, NKG2A, FcRH1/IRTA5, NKG2C, FcRH2/IRTA4, NKG2D, FcRH4/IRTA1, NKp30, FcRH5/IRTA2, NKp44, similar al receptor Fc 3/CD16-2, NKp46/NCR1, NKp80/KLRF1, NTB-A/SLAMF6, Rae-1, Rae-1 alfa, Rae-1 beta, Rae-1 delta, H60, Rae-1 épsilon, ILT2/CD85j, Rae-1 gamma, ILT3/CD85k, TREM-1, ILT4/CD85d, TREM-2, ILT5/CD85a, TREM-3, KIR/CD158, TREML1/TLT-1, KIR2DL1, ULBP-1, KIR2DL3, ULBP-2, KIR2DL4/CD158d y ULBP-3.

En otra formas de realización la diana de las células monocíticas/macrófagas se selecciona del grupo que consta de B7-1/CD80, ILT4/CD85d, B7-H1, ILT5/CD85a, cadena beta común, integrina alfa 4/CD49d, BLAME/SLAMF8, integrina alfa X/CD11c, CCL6/C10, integrina beta 2/CD18, CD155/PVR, integrina beta 3/CD61, CD31/PECAM-1, latexina, CD36/SR-B3, leucotrieno B4 R1, CD40/TNFRSF5, LIMPII/SR-B2, CD43, LMIR1/CD300A, CD45, LMIR2/CD300c, CD68, LMIR3/CD300LF, CD84/SLAMF5, LMIR5/CD300LB, CD97, LMIR6/CD300LE, CD163, LRP-1, CD2F-10/SLAMF9, MARCO, CRACC/SLAMF7, MD-1, ECF-L, MD-2, EMMPRIN/CD147, MGL2, endoglina/CD105, osteoactivina/GPNMB, Fc gamma RI/CD64, osteopontina, Fc gamma RIIB/CD32b, PD-L2, Fc gamma RIIC/CD32c, Siglec-3/CD33, Fc gamma RIIA/CD32a, SIGNR1/CD209, Fc gamma RIII/CD16, SLAM, GM-CSF R alfa, TCCR/WSX-1, ICAM-2/CD102, TLR3, IFN-gamma R1, TLR4, IFN-gamma R2, TREM-1, IL-1 RII, TREM-2, ILT2/CD85j, TREM-3, ILT3/CD85k, TREML1/TLT-1, 2B4/SLAMF4, IL-10 R alfa, ALCAM, IL-10 R beta,

aminopeptidasa N/ANPEP, ILT2/CD85j, cadena beta común, ILT3/CD85k, C1q R1/CD93, ILT4/CD85d, CCR1, ILT5/CD85a, CCR2, integrina alfa 4/CD49d, CCR5, integrina alfa M/CD11b, CCR8, integrina alfa X/CD11c, CD155/PVR, integrina beta 2/CD18, CD14, integrina beta 3/CD61, CD36/SR-B3, LAIR1, CD43, LAIR2, CD45, leucotrieno B4 R1, CD68, LIMPII/SR-B2, CD84/SLAMF5, LMIR1/CD300A, CD97, LMIR2/CD300c, CD163, LMIR3/CD300LF, factor de coagulación III/factor tisular, LMIR5/CD300LB, CX3CR1, CX3CL1, LMIR6/CD300LE, CXCR4, LRP-1, CXCR6, M-CSF R, DEP-1/CD148, MD-1, DNAM-1, MD-2, EMMPRIN/CD147, MMR, endoglina/CD105, NCAM-L1, Fc gamma RI/CD64, PSGL-1, Fc gamma RIII/CD16, RP105, G-CSF R, L-selectina, GM-CSF R alfa, Siglec-3/CD33, HVEM/TNFRSF14, SLAM, ICAM-1/CD54, TCCR/WSX-1, ICAM-2/CD102, TREM-1, IL-6 R, TREM-2, CXCR1/IL-8 RA, TREM-3 y TREML1/TLT-1.

Aún en otras formas de realización del método, la diana de la célula dendrítica se selecciona del grupo que consta de CD36/SR-B3, LOX-1/SR-E1, CD68, MARCO, CD163, SR-AI/MSR, CD5L, SREC-I, CL-P1/COLEC12, SREC-II, LIMPII/SR-B2, RP105, TLR4, TLR1, TLR5, TLR2, TLR6, TLR3, TLR9, ligando 4-1BB/TNFSF9, IL-12/IL-23 p40, 4-amino-1,8-naftalimida, ILT2/CD85j, CCL21/6Cquina, ILT3/CD85k, 8-oxo-dG, ILT4/CD85d, 8D6A, ILT5/CD85a, A2B5, integrina alfa 4/CD49d, Aag, integrina beta 2/CD18, AMICA, langerina, B7-2/CD86, leucotrieno B4 R1, B7-H3, LMIR1/CD300A, BLAME/SLAMF8, LMIR2/CD300c, C1q R1/CD93, LMIR3/CD300LF, CCR6, LMIR5/CD300LB, CCR7, LMIR6/CD300LE, CD40/TNFRSF5, MAG/Siglec-4a, CD43, MCAM, CD45, MD-1, CD68, MD-2, CD83, MDL-1/CLEC5A, CD84/SLAMF5, MMR, CD97, NCAM-L1, CD2F-10/SLAMF9, osteoactivina/GPNMB, Chem 23, PD-L2, CLEC-1, RP105, CLEC-2, Siglec-2/CD22, CRACC/SLAMF7, Siglec-3/CD33, DC-SIGN, Siglec-5, DC-SIGNR/CD299, Siglec-6, DCAR, Siglec-7, DCIR/CLEC4A, Siglec-9, DEC-205, Siglec-10, dectina-1/CLEC7A, Siglec-F, dectina-2/CLEC6A, SIGNR1/CD209, DEP-1/CD148, SIGNR4, DLEC, SLAM, EMMPRIN/CD147, TCCR/WSX-1, Fc gamma

RI/CD64, TLR3, Fc gamma RIIB/CD32b, TREM-1, Fc gamma RIIC/CD32c, TREM-2, Fc gamma RIIA/CD32a, TREM-3, Fc gamma RIII/CD16, TREML1/TLT-1, ICAM-2/CD102 y vaniloide R1.

Aún en otras formas de realización del método, la diana de angiogénesis se selecciona del grupo que consta de angiopoyetina-1, similar a angiopoyetina 2, angiopoyetina-2, similar a angiopoyetina 3, angiopoyetina-3, similar a angiopoyetina 7/CDT6, angiopoyetina-4, Tie-1, similar a angiopoyetina 1, Tie-2, angiogenina, iNOS, factor de coagulación III/factor tisular, nNOS, CTGF/CCN2, NOV/CCN3, DANCE, OSM, EDG-1, Plfr, EG-VEGF/PK1, proliferina, endostatina, ROBO4, eritropoyetina, trombospondina-1, quininostatina, trombospondina-2, MFG-E8, trombospondina-4, óxido nítrico, VG5Q, eNOS, EphA1, EphA5, EphA2, EphA6, EphA3, EphA7, EphA4, EphA8, EphB1, EphB4, EphB2, EphB6, EphB3, efrina-A1, efrina-A4, efrina-A2, efrina-A5, efrina-A3, efrina-B1, efrina-B3, efrina-B2, FGF ácido, FGF-12, FGF básico, FGF-13, FGF-3, FGF-16, FGF-4, FGF-17, FGF-5, FGF-19, FGF-6, FGF-20, FGF-8, FGF-21, FGF-9, FGF-23, FGF-10, KGF/FGF-7, FGF-11, FGF R1, FGF R4, FGF R2, FGF R5, FGF R3, neuropilina-1, neuropilina-2, semaforina 3A, semaforina 6B, semaforina 3C, semaforina 6C, semaforina 3E, semaforina 6D, semaforina 6A, semaforina 7A, MMP, MMP-11, MMP-1, MMP-12, MMP-2, MMP-13, MMP-3, MMP-14, MMP-7, MMP-15, MMP-8, MMP-16/MT3-MMP, MMP-9, MMP-24/MT5-MMP, MMP-10, MMP-25/MT6-MMP, TIMP-1, TIMP-3, TIMP-2, TIMP-4, ACE, IL-13 R alfa 1, IL-13, C1q R1/CD93, integrina alfa 4/CD49d, VE-caderina, integrina beta 2/CD18, CD31/PECAM-1, KLF4, CD36/SR-B3, LYVE-1, CD151, MCAM, CL-P1/COLEC12, nectina-2/CD112, factor de coagulación III/factor tisular, E-selectina, D6, P-selectina, DC-SIGNR/CD299, SLAM, EMMPRIN/CD147, Tie-2, endoglina/CD105, TNF RI/TNFRSF1A, EPCR, TNF RII/TNFRSF1B, eritropoyetina R, TRAIL R1/TNFRSF10A, ESAM, TRAIL R2/TNFRSF10B, FABP5, VCAM-1, ICAM-1/CD54, VEGF R2/Flk-1, ICAM-2/CD102, VEGF R3/Flt-4, IL-1 RI y VG5Q.

Otras formas de realización del método proporcionan proteínas de enlace multivalentes, donde al menos uno del dominio de enlace 1 y de dominio de enlace 2 se enlaza específicamente a la diana seleccionada del grupo que consta de antígeno de membrana específico de la próstata (folato hidrolasa 1), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor de productos terminales de glicación avanzada (RAGE, también conocido como receptor de productos terminales de glicosilación avanzada ó AGER), IL-17 A, IL-17 F, P19 (IL23A e IL12B), Dickkopf-1 (Dkk1), NOTCH1, NG2 (sulfato de condroitina proteoglicano 4 ó CSPG4), IgE (IgHE o IgH2), IL-22R (IL22RA1), IL-21, oligómeros beta-amiloide (oligómeros Ab), proteína del precursor beta-amiloide (APP), receptor NOGO (RTN4R), proteína relacionada al receptor de liproteínas de baja densidad 5 (LRP5), IL-4, miostatina (GDF8), antígeno muy tardío 4, un alfa 4, integrina beta 1 (VLA4 o ITGA4), alfa 4, integrina beta 7 encontrada en leucocitos e IGF-1R. Por ejemplo, una diana VLA4 puede reconocerse por una proteína de enlace multivalente, donde al menos uno del dominio de enlace 1 y el dominio de enlace 2 es un dominio de enlace derivado de natalizumab (Antegren).

En algunas formas de realización, la célula cancerígena es una célula hematopoyética transformada o cancerígena. En ciertas de estas formas de realización, al menos uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace reconoce una diana seleccionada del grupo que consta de una diana de los linfocitos B, una diana monocítica/macrófaga, una diana de células dendríticas, una diana de células NK y una diana de los linfocitos T, cada una de ellas tal como se las define en la presente. Además, al menos uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace puede reconocer dianas mieloides, incluso sin limitación CD5, CD10, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27, CD29, CD30, CD31, CD33, CD34, CD35, CD38, CD43, CD45, CD64, CD66, CD68, CD70, CD80, CD86, CD87, CD88, CD89, CD98, CD100, CD103, CD111, CD112, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CDw123, CDw131,

CD141, CD162, CD163, CD177, CD312, IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4, IRTA5, B-B2, B-B8 y receptores del antígeno de los linfocitos B.

Otras formas de realización de la invención se refieren a la proteína de enlace multivalente, según se describe en la presente, que comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consta de las SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 103, 105, 107, 109, 332, 333, 334 y 345. Otras formas de realización se refieren a la proteína de enlace multivalente que comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consta de las SEQ ID NOS: 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364 y 365.

En otras formas de realización, la proteína de enlace multiespecífica y multivalente con función efectora tiene un primer dominio de enlace y un segundo dominio de enlace, que reconocen un par de dianas seleccionadas del grupo que consta de EPHB4-KDR y TIE-TEK. En tales formas de realización, la proteína tiene un primer dominio de enlace que reconoce EPHB4 y un segundo dominio de enlace que reconoce KDR, o un primer dominio de enlace que reconoce KDR y un segundo dominio de enlace que reconoce EPHB4. En forma análoga, la proteína puede tener un primer dominio de enlace que reconoce TIE y un segundo dominio de enlace que reconoce TEK, o un primer dominio de enlace que reconoce TEK y un segundo dominio de enlace que reconoce TIE.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona una proteína de enlace multivalente con función efectora, donde la subregión constante reconoce un receptor Fc de célula efectora (por ejemplo, $F_C\gamma RI$, $F_C\gamma RII$, $F_C\gamma RIII$, $F_C\alpha R$ y $F_C\varepsilon RI$). En formas de realización particulares, la subregión constante reconoce una proteína de la superficie de la célula efectora que se selecciona del grupo que consta de CD2, CD3, CD16, CD28, CD32, CD40, CD56, CD64, CD89, $F_{C\varepsilon}RI$, KIR, trombospondina R, NKG2D, 2B4/NAIL y 41BB. La subregión constante puede comprender un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3} derivados de iguales o diferentes inmunoglobulinas, isotipos de anticuerpos o variantes alélicas. En algunas formas de realización, el dominio C_{H3} está truncado, y

comprende una secuencia C terminal que se selecciona del grupo que consta de las SEQ ID NOS: 366, 367, 368, 369, 370 y 371. Con preferencia, el dominio C_{H2} y el ligador de escorpión derivan de la misma clase, o de la misma subclase, de inmunoglobulina, cuando el ligador es un péptido similar a bisagra derivado de una inmunoglobulina.

También se contempla que algunas proteínas según la invención comprendan un ligador de escorpión de al menos 5 aminoácidos, aproximadamente, unidos a la subregión constante y unidos al segundo dominio de enlace, de ese modo se localiza el ligador de escorpión entre la subregión constante y el segundo dominio de enlace. De manera característica, la longitud del péptido del ligador de escorpión es de entre 5 y 45 aminoácidos. Los ligadores de escorpión incluyen péptidos similares a bisagra derivados de las regiones de bisagra de inmunoglobulina, como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA y las regiones de bisagra de la IgE. Preferentemente, un ligador de escorpión similar a bisagra retendrá al menos una cisteína capaz de formar un enlace disulfuro intercatenario en condiciones fisiológicas. Los ligadores de escorpión derivados de la IgG1 pueden tener 1 cisteína o dos cisteínas y, con preferencia, retendrán la cisteína correspondiente a una cisteína de bisagra en el extremo N terminal de la IgG1. En algunas formas de realización, el ligador de escorpión se extiende respecto de una región de bisagra de inmunoglobulina cognada y, en las formas de realización de ejemplo, comprende una secuencia seleccionado del grupo que consta de las SEQ ID NOS: 351, 352, 353 y 354. Los péptidos no-similares a bisagra también se contemplan como ligadores de escorpión, siempre que tales péptidos prevean separación y flexibilidad suficientes para proporcionar una proteína monocatenaria capaz de formar dos dominios de enlace, uno ubicado hacia cada extremo terminal (N y C) de la proteína respecto de un dominio de la subregión constante ubicado en posición más central. Los ejemplos de ligadores de escorpión no-similares a bisagras incluyen péptidos de la región tallo de lectinas del tipo II C, tales como las regiones tallo de CD69, CD72, CD94,

NKG2A y NKG2D. En algunas formas de realización, el ligador de escorpión comprende una secuencia seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID NOS: 373, 374, 375, 376 y 377.

Las proteínas también pueden comprender un ligador de, al menos, cerca de 5 aminoácidos unidos a la subregión constante y unidos al primer dominio de enlace, de ese modo ubicando el ligador entre la subregión constante y el primer dominio de enlace. En algunas formas de realización, los ligadores se encuentran entre la subregión constante y cada uno de los dos dominios de enlace, y esos ligadores pueden ser de la misma o diferente secuencia, y de las mismas o diferentes longitudes.

La subregión constante de las proteínas según la invención proporciona al menos una función efectora. Se contempla cualquier función efectora conocida en el arte que se habrá de asociar con una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo), de manera tal que una función efectora seleccionada del grupo que consta de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), semivida *in vivo* relativamente prolongada (respecto de la misma molécula que carece de una subregión constante), enlace Fcr, enlace de la proteína A y demás similares. En algunas formas de realización, las semividas extendidas de las proteínas de la invención son de 28 horas, como mínimo, en un ser humano. Desde luego, las proteínas destinadas a la administración a sujetos no-humanos presentarán semividas relativamente prolongados en esos sujetos no-humanos y no necesariamente en los seres humanos.

En general, las proteínas (incluidos los polipéptidos y péptidos) de la invención presentan una afinidad de enlace de menos de 10^{-9}M, o al menos 10^{-6}M, para al menos uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una proteína según se describe aquí y un coadyuvante, portador o

excipiente farmacéuticamente aceptable. Cualquier coadyuvante, portador o excipiente conocido en el arte es útil en las composiciones farmacéuticas de la invención.

Igualmente, otro aspecto de la invención proporciona un método para producir una proteína que se describió previamente, que comprende introducir un ácido nucleico que codifica la proteína en una célula hospedante e incubar la célula hospedante en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína, con lo cual se expresa la proteína, con preferencia en un nivel de 1 mg/litro, como mínimo. En algunas formas de realización, el método también comprende aislar la proteína, separándola de, al menos, una proteína con la cual está asociada en una expresión intracelular. Las células hospedantes adecuadas para expresar los ácidos nucleicos para producir las proteínas de la invención incluyen, sin limitación, una célula hospedante seleccionada del grupo que consta de una célula VERO, una célula HeLa, una célula CHO, una célula COS, una célula W138, una célula BHK, una célula HepG2, una célula 3T3, una célula RIN, una célula MDCK, una célula A549, una célula PC12, una célula K562, una célula HEK293, una célula N, una célula *Spodoptera frugiperda,* una célula *Saccharomyces cerevisiae*, una célula *Pichia pastoris*, cualquiera de una variedad de células fúngicas y cualquiera de una variedad de células bacterianas (incluso sin limitación, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y un estreptomiceto).

La invención también proporciona un método para producir un ácido nucleico que codifica la proteína, según se describió, que comprende: enlazar de manera covalente el extremo 3' de un polinucleótido que codifica un primer dominio de enlace derivado de una región variable de la inmunoglobulina al extremo 5' de un polinucleótido que codifica una subregión constante; enlazar de manera covalente el extremo 5' de un polinucleótido que codifica un ligador de escorpión al extremo 3' del polinucleótido que codifica la subregión constante; y enlazar de manera covalente el extremo 5' de un polinucleótido que codifica un segundo dominio de enlace derivado de una región variable de la inmunoglobulina con el extremo 3' del polinucleótido que codifica el

ligador de escorpión, con lo cual se genera un ácido nucleico que codifica una proteína de enlace multivalente con función efectora. Cada una de estas regiones codificantes puede estar separada por una región codificante para un ligador o péptido similar a bisagra como parte de una estructura monocatenaria según la invención. En algunas formas de realización, el método produce un polinucleótido que codifica un primer dominio de enlace que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consta de la SEQ ID NO: 2 (región variable anti-CD20, V_L-V_H orientadas), SEQ ID NO: 4 (región variable anti-CD28, V_L-V_H orientadas), y SEQ ID NO: 6 (región variable anti-CD28, V_L-V_H orientadas), en forma monocatenaria, en lugar de requerir el ensamble de polipéptidos codificados por separado, como debe suceder para las proteínas multiméricas, incluso los anticuerpos naturales. Los ejemplos de secuencias de polinucleótidos que codifican los primeros dominios de enlace son polinucleótidos que comprenden cualquiera de las SEQ ID NOS: 1, 3 ó 5.

Este aspecto de la invención también proporciona métodos para producir ácidos nucleicos codificantes que también comprenden un polinucleótido ligador insertado entre el polinucleótido que codifica un primer dominio de enlace y el polinucleótido que codifica una subregión constante, el polinucleótido ligador codifica un ligador peptídico de 5 aminoácidos, como mínimo. Además, estos métodos producen ácidos nucleicos que también comprenden un polinucleótido ligador insertado entre el polinucleótido que codifica una subregión constante y el polinucleótido que codifica un segundo dominio de enlace, el polinucleótido ligador codifica un ligador peptídico de 5 aminoácidos, como mínimo. Preferentemente, los ligadores peptídicos codificados tienen entre 5 y 45 aminoácidos.

La identidad de las regiones ligadoras presentes entre BD1 y EFD o EFD y BD2 puede derivarse de otras secuencias identificadas de los miembros de la superfamilia de Ig homóloga. Al crear ligadores novedosos derivados de las secuencias existentes presentes en los miembros homólogos de la superfamilia de la Ig, quizá sea preferible

evitar las extensiones de la secuencia similares a las ubicadas entre el final de un dominio similar a C y el dominio de transmembrana, ya que tales secuencias son a menudo los sustratos para el clivado por proteasas de los receptores superficiales de la célula para crear formas solubles. Las comparaciones de secuencias entre los miembros diferentes de la superfamilia y las subfamilias de Ig pueden compararse para identificar semejanzas entre las moléculas en las secuencias ligadoras que unen múltiples dominios similares a V o entre los dominios similares a V y C. De este análisis, pueden surgir patrones de secuencias naturales y conservadas; estas secuencias cuando se usan como los ligadores entre los subdominios de las proteínas de fusión multivalentes deben ser más resistentes a las proteasas, podrían facilitar el correcto plegamiento entre las regiones en bucle de Ig, y no sería inmunógeno ya que se producen en los dominios extracelulares de las moléculas superficiales de células endógenas.

Los ácidos nucleicos propiamente dichos comprenden otro aspecto de la invención. Se contemplan los ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las proteínas de la invención que se describen en la presente. Como tal, los ácidos nucleicos de la invención comprenden, en orden de 5' a 3', una región codificante para un primer dominio de enlace, una secuencia de la subregión constante y una región codificante para un segundo dominio de enlace. También se contemplan los ácidos nucleicos que codifican las variantes proteicas donde los dos dominios de enlace y las secuencias de la subregión constante tienen secuencias de aminoácidos que son, en conjunto, al menos 80% y preferentemente al menos 85%, 90%, 95%, o 99%, idénticas a las secuencias combinadas de una región variable de inmunoglobulina conocida y una secuencia de la subregión constante conocida. Alternativamente, las variantes proteicas de la invención son codificadas por los ácidos nucleicos que se hibridan en un ácido nucleico que codifica una proteína no-variante de la invención en condiciones rigurosas de hibridación de 0,015 M de cloruro de sodio; 0,0015 M de citrato de sodio a

65-68°C ó 0,015 M de cloruro de sodio; 0,0015 M de citrato de sodio y 50% de formamida a 42°C. Las variantes de ácidos nucleicos de la invención presentan la capacidad de hibridarse en las condiciones definidas previamente, o exhiben 90%, 95%, 99%, o 99,9% de identidad de la secuencia con un ácido nucleico que codifica una proteína no-variante según la invención.

En los aspectos relacionados, la invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico como se describió anteriormente, así como las células hospedantes que comprenden un vector o un ácido nucleico según se describe aquí. Puede usarse cualquier vector conocido en el arte (por ejemplo, plásmidos, fagémidos, fásmidos, cósmidos, virus, cromosomas artificiales, vectores lanzadera y demás similares) y los expertos en el arte reconocerán qué vectores en particular son convenientes para una finalidad dada. Por ejemplo, en los métodos para producir una proteína según la invención, se selecciona un vector de expresión operable en la célula hospedante preferida. De la manera similar, se contempla cualquier célula hospedante capaz de transformarse genéticamente con un ácido nucleico o vector de la invención. Las células hospedantes preferidas son las células hospedantes eucariotas superiores, aunque se contemplan células hospedantes eucariotas inferiores (por ejemplo, la levadura) y las células hospedantes procariotas (bacterianas).

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de provocar daño a una célula diana, que comprende poner en contacto una célula diana con una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína según se describe aquí. En algunas formas de realización, la célula diana se contacta *in vivo* mediante la administración de la proteína, o un ácido nucleico codificante, a un organismo que lo necesita. Dentro de este aspecto de la invención se contemplan los métodos en los que la proteína de enlace monocatenaria multivalente induce una cantidad acumulativa de daño a la célula diana, que es la cantidad de daño esperado de la suma del daño atribuible a los anticuerpos separados que comprenden uno u otro de los dominios de enlace. También se

contemplan los métodos donde la proteína de enlace multivalente monocatenaria provoca una cantidad sinérgica de daño a la célula diana comparado con la suma del daño provocado por un primer anticuerpo que comprende el primer dominio de enlace pero no el segundo dominio de enlace, y un segundo anticuerpo que comprende el segundo dominio de enlace pero no el primer dominio de enlace. En algunas formas de realización, la proteína de enlace multivalente monocatenaria es multiespecífica y comprende un par de dominios de enlace, que específicamente reconoce un par de antígenos seleccionados del grupo que consta de CD19/CD20, CD20/CD21, CD20/CD22, CD20/CD40, CD20/CD79a, CD20/CD79b, CD20/CD81, CD21/CD79b, CD37/CD79b, CD79b/CD81, CD19/CL II (es decir, MHC clase II), CD20/CL II, CD30/CL II, CD37/CL II, CD72/CL II, y CD79b/CL II.

Este aspecto de la invención también comprende métodos en los que la proteína de enlace multivalente monocatenaria y multiespecífica provoca una cantidad sinérgica de daño a la célula diana comparado con la suma del daño provocado por un primer anticuerpo que comprende el primer dominio de enlace pero no el segundo dominio de enlace y un segundo anticuerpo que comprende el segundo dominio de enlace pero no el primer dominio de enlace. Las formas de realización de ejemplo incluyen métodos donde la proteína de enlace multivalente monocatenaria y multiespecífica comprende un par de dominios de enlace, que específicamente reconoce un par de antígenos seleccionados del grupo que consta de CD20/CL II, CD21/CD79b, CD22/CD79b, CD40/CD79b, CD70/CD79b, CD72/CD79b, CD79a/CD79b, CD79b/CD80, CD79b/CD86, CD21/CL II, CD22/CL II, CD23/CL II, CD40/CL II, CD70/CL II, CD80/CL II, CD86/CL II, CD19/CD22, CD20/CD22, CD21/CD22, CD22/CD23, CD22/CD30, CD22/CD37, CD22/CD40, CD22/CD70, CD22/CD72, CD22/79a, CD22/79b, CD22/CD80, CD22/CD86 y CD22/CL II.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para tratar un trastorno proliferativo celular, por ejemplo, el cáncer, que comprende administrar una

cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína (según se describe aquí), o un ácido nucleico codificante, a un organismo que lo necesita. Los expertos en el arte, incluidos los profesionales médicos y veterinarios, son versados en identificar los organismos necesitados del tratamiento. Los trastornos contemplados por la invención como susceptibles del tratamiento incluyen un trastorno seleccionado del grupo que consta de cáncer, trastorno auto-inmunitario, infección por virus del sarcoma de Rous e inflamación. En algunas formas de realización, la proteína se administra mediante la expresión *in vivo* de un ácido nucleico que codifica la proteína según se describe aquí. La invención también comprende administrar la proteína por una vía seleccionada del grupo que consta de inyección intravenosa, inyección intraarterial, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intraperitoneal e inyección tisular directa.

Otro aspecto de la invención se dirige a un método para aliviar un síntoma asociado con un trastorno proliferativo celular que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína según se describe aquí, a un organismo que lo necesita. Los expertos en el arte son también idóneos para identificar los trastornos, enfermedades o afecciones que presentan los síntomas susceptibles de la mejora. En algunas formas de realización, el síntoma se selecciona del grupo que consta de dolor, calor, hinchazón y rigidez de las articulaciones.

No obstante, otro aspecto de la invención se refiere a un método para tratar una infección asociada con un agente infeccioso que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína según la invención a un paciente que lo necesita, donde la proteína comprende un dominio de enlace que específicamente se enlaza a una molécula diana del agente infeccioso. Los agentes infecciosos que se pueden tratar según este aspecto de la invención incluyen células procariotas y eucariotas, virus (incluidos los bacteriófagos), objetos extraños y organismos infecciosos como los parásitos (por ejemplo, parásitos mamíferos).

Un aspecto relacionado de la invención se refiere a un método para aliviar un síntoma de una infección asociada con un agente infeccioso que comprende la administración de una cantidad eficaz de una proteína según la invención a un paciente que lo necesita, donde la proteína comprende un dominio de enlace que específicamente se enlaza a una molécula diana del agente infeccioso. Los expertos en las artes médicas y veterinarias podrán determinar una cantidad eficaz de una proteína caso por caso, usando la experimentación corriente.

Aún otro aspecto relacionado de la invención se refiere a un método para reducir el riesgo de infección que se atribuye a un agente infeccioso que comprende administrar una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína según la invención, a un paciente que está en riesgo de padecer la infección, donde la proteína comprende un dominio de enlace que específicamente se enlaza a una molécula diana del agente infeccioso. Los expertos en las artes pertinentes podrán determinar una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína caso por caso, usando la experimentación corriente.

Otro aspecto de la invención se refiere a la citada proteína de enlace multivalente monocatenaria, donde al menos uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace se enlaza específicamente a un antígeno seleccionado del grupo que consta de CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 y un péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad.

En ciertas formas de realización, uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace se enlaza específicamente a la molécula CD20 y, en algunas de estas formas de realización, el otro dominio de enlace se enlaza específicamente a un antígeno seleccionado del grupo que consta de CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 y un péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad. Por ejemplo, en una forma de

realización, el primer dominio de enlace es capaz de enlazar específicamente la molécula CD20, mientras que el segundo dominio de enlace es capaz de enlazar específicamente, por ejemplo, la molécula CD19. En otra forma de realización, el primer dominio de enlace se enlaza a la molécula CD19, mientras que el segundo dominio de enlace se enlaza a la molécula CD20. También se contempla una forma de realización en la cual ambos dominios de enlace se unen a la molécula CD20.

En ciertas otras formas de realización según este aspecto de la invención, uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace se enlaza específicamente a la molécula CD79b y, en algunas de estas formas de realización, el otro dominio de enlace se enlaza específicamente a un antígeno seleccionado del grupo que consta de CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 y un péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad. Los ejemplos de formas de realización incluyen proteínas de enlace multivalentes, monocatenarias y multiespecíficas en las cuales un primer dominio de enlace: segundo dominio de enlace específicamente se unen a CD79b:CD19 o CD19:CD79b. También se encuentra comprendida una proteína de enlace multivalente que tiene dominios de enlace primero y segundo que reconocen CD79b.

Aún en ciertas otras formas de realización, uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace se enlaza específicamente a un péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad, y en algunas de estas formas de realización, el otro dominio de enlace específicamente se enlaza aun antígeno seleccionado del grupo que consta de CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 y un péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad. Por ejemplo, en una forma de realización, el primer dominio de enlace es capaz de enlazar específicamente un péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad, mientras que el segundo dominio de enlace

es capaz de enlazarse específicamente, por ejemplo, a CD19. En otra forma de realización, el primer dominio de enlace se enlaza a la molécula CD19 mientras que el segundo dominio de enlace se enlaza a un péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad. También se contempla una forma de realización en la cual ambos dominios de enlace se enlazan a un péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad.

Aún en otras formas de realización según este aspecto de la invención, uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace se enlaza específicamente a la molécula CD22 y, en algunas de estas formas de realización, el otro dominio de enlace se enlaza específicamente a un antígeno seleccionado del grupo que consta de CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 y un péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad. Los ejemplos de formas de realización incluyen proteínas de enlace multivalentes monocatenarias y multiespecíficas en las cuales un primer dominio de enlace: un segundo dominio de enlace específicamente se enlazan a CD22:CD19 o CD19:CD22. También se encuentra comprendida una proteína de enlace multivalente que tiene dominios de enlace primero y segundo que reconocen la molécula CD22.

Un aspecto relacionado de la invención se refiere a la proteína de enlace multivalente monocatenaria que se describió, donde la proteína tiene un efecto sinérgico sobre una célula diana con respecto a la suma de los efectos de cada uno de los dominios de enlace. En algunas formas de realización, la proteína comprende un par del dominio de enlace que reconoce específicamente un par de antígenos seleccionados del grupo que consta de CD20-CD19, CD20-CD21, CD20-CD22, CD20-CD40, CD20-CD79a, CD20-CD79b y CD20-CD81.

La invención también comprende una proteína de enlace multivalente monocatenaria que se describió, donde la proteína tiene un efecto acumulativo sobre el comportamiento de una célula diana con respecto a la suma de los efectos de cada uno

de los dominios de enlace. Las formas de realización según este aspecto de la invención incluyen proteínas multiespecíficas que comprenden un par dominios de enlace que reconoce específicamente un par de antígenos seleccionados del grupo que consiste de CD20-CD23, CD20-CD30, CD20-CD37, CD20-CD70, CD20-CD80, CD20-CD86, CD79b-CD37, CD79b-CD81, un péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD30 y un péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD72.

También otro aspecto relacionado de la invención es una proteína de enlace multivalente monocatenaria que se describió, donde la proteína tiene un efecto inhibidor sobre el comportamiento de una célula diana con respecto a la suma de los efectos de cada uno de los dominios de enlace. En algunas formas de realización la proteína es multiespecífica y comprende un par de dominios de enlace, que específicamente reconoce el par de antígenos seleccionados del grupo que consta de CD20-péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad, CD79b-CD19, CD79b-CD20, CD79b-CD21, CD79b-CD22, CD79b-CD23, CD79b-CD30, CD79b-CD40, CD79b-CD70, CD79b-CD72, CD79b-CD79a, CD79b-CD80, CD79b-CD86, CD79b-péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD19, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD20, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD21, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD22, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD23, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD37, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD40, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD70, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD79a, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD79b, péptido de clase II del complejo principal de

histocompatibilidad-CD80, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD81, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD86, CD22-CD19, CD22-CD40, CD22-CD79b, CD22-CD86 y CD22-péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad.

Otro aspecto de la invención es un método para identificar al menos uno de los dominios de enlace de la molécula de enlace multivalente, tal como una molécula de enlace multiespecífica, que ya se describió y que comprende: (a) poner en contacto un anticuerpo anti-isotípico con un anticuerpo que reconoce específicamente un primer antígeno y un anticuerpo que reconoce específicamente un segundo antígeno; (b) también poner en contacto una diana que comprende al menos uno de dichos antígenos con la composición del paso (a); y (c) medir una actividad de la diana, donde la actividad se usa para identificar al menos uno de los dominios de enlace de la molécula de enlace multivalente. En algunas formas de realización, la diana es una célula enferma, tal como una célula cancerosa (por ejemplo, un linfocito B canceroso) o un linfocito B productor de auto-anticuerpos.

En cada uno de los métodos de la invención citados, se contempla que el método también comprenda una pluralidad de proteínas de enlace multivalentes monocatenarias. En algunas formas de realización, un dominio de enlace de una primera proteína de enlace multivalente monocatenaria y un dominio de enlace de una segunda proteína de enlace multivalente monocatenaria inducen un efecto sinérgico, acumulativo o inhibitorio sobre una célula diana, tal como una cantidad sinérgica, acumulativa o inhibitoria de daño a la célula diana. Los efectos sinérgicos, acumulativos o inhibitorios de una pluralidad de proteínas de enlace multivalentes monocatenarias se determinan al comparar el efecto de dicha pluralidad de proteínas con el efecto combinado de un anticuerpo que comprende uno de los dominios de enlace y un anticuerpo que comprende el otro dominio de enlace.

Un aspecto relacionado de la invención se refiere a una composición que comprende una pluralidad de proteínas de enlace multivalentes monocatenarias, como ya se describió. En algunas formas de realización, la composición comprende una pluralidad de proteínas de enlace multivalentes monocatenarias, donde un dominio de enlace de una primera proteína de enlace multivalente monocatenaria y un dominio de enlace de una segunda proteína de enlace multivalente monocatenaria tienen la capacidad de inducir un efecto sinérgico, acumulativo o inhibitorio sobre una célula diana, tal como una cantidad sinérgica, acumulativa o inhibitoria de daño a la célula diana.

La invención también alcanza a una composición farmacéutica que comprende la composición descripta anteriormente y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Además, la invención comprende un kit que incluye la composición según se describe aquí y un conjunto de instrucciones para administrar dicha composición a fin de ejercer un efecto sobre una célula diana, como el daño de la célula diana.

Finalmente, la invención también comprende un kit que comprende la proteína que se describe aquí y un conjunto de instrucciones para administrar la proteína para tratar un trastorno de la proliferación de células o para aliviar un síntoma del trastorno de la proliferación de células.

Las otras características y ventajas de la presente invención se comprenderán mejor por referencia a la siguiente descripción detallada, incluidos los ejemplos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra una representación esquemática de moléculas multivalentes monocatenarias previstas por la invención. Los subdominios individuales del casete para la expresión de proteínas de fusión están indicados por formas / bloques separados en la figura. BD1 se refiere al dominio de enlace 1, el ligador 1 se

refiere a cualquier ligador potencial o péptido similar a bisagra entre BD1 y el "dominio de función efectora", indicado como EFD. Este subdominio, usualmente, es una forma diseñada por ingeniería genética del dominio Fc de la IgG1 humana, pero puede incluir otros subdominios con una o más funciones efectoras, tal como se define en la presente. El ligador 2 se refiere a una secuencia ligadora, si la hay, presente entre el extremo carboxi terminal del EFD y el dominio de enlace 2, BD2.

La **Figura 2** muestra un análisis por transferencia Western (*Western blot*) de proteínas no-reducidas expresadas en células COS. La proteína se secretó en el medio de cultivo, y los sobrenadanetes del cultivo se aislaron después de 48 a 72 horas desde la transfección transitoria de las células por centrifugación. Treinta microlitros, 30 µl, de sobrenadante en crudo se cargaron en cada pocillo del gel. Identificaciones de los carriles: 1-marcadores de peso molecular, con numerales que indican kilodaltons; 2-2H7-IgG-STD1-2E12 LH; 3- 2H7-IgG-STD1-2E12 HL, 4- 2H7-IgG-STD2-2E12 LH; 5-2H7-IgG-STD2-2E12 HL; 6- 2E12 LH SMIP; 7- 2E12 HL SMIP; 8- 2H7 SMIP. "2H7" hace referencia a una construcción monocatenaria, donde BD1 codifica el dominio de enlace específico de CD20 (2H7) en la orientación VLVH; "2E12" se refiere a un dominio de enlace específico para la molécula CD28; IgG se refiere a una construcción monocatenaria, con una bisagra que codifica una secuencia donde todas las C están mutadas a S (sss), y los dominios CH2 y CH3 de la IgG1 contienen mutaciones que eliminan las funciones efectoras de ADCC y de CDC (P238S y P331 S), "STD 1" se refiere a un ligador de 20 aminoácidos (identificado en la Figura 7 como "STD1=20aa ") inserto en una posición adyacente al BD2 en la orientación VL-VH, o 2E12 (V_L-V_H). "STD1- HL" se refiere a una construcción similar a la que se acaba de describir, pero con las regiones BD2V en la orientación VH-VL de la siguiente manera: 2H7-sssIgG (P238/331S)-ligador de 20 aminoácidos-2E12 (V_H-V_L). "STD2- LH" se refiere a 2H7-sssIgG (P238/331S)-ligador de 38-aminoácidos-2E12 (V_L-V_H); "STD2-LH" se refiere a 2H7-sssIgG (P238/331SS)-ligador de 38 aminoácidos-2E12 (V_H-V_L); "SMIP" se refiere a

un inmunofarmacéutico modular; y "H", en general, se refiere a V_H, mientras que "L", en general, se refiere a V_L. Salvo que se indique lo contrario, todas las orientaciones de las proteínas son orientaciones del extremo N terminal al extremo C terminal.

La **Figura 3** muestra dos gráficos de columnas que ilustran las propiedades de enlace de 2H7-sslgG (P238S/P331S)-STD1-2e12 LH y los derivados HL expresados a partir de las células COS. Estos experimentos se realizaron con sobrenadantes de cultivo en bruto, en lugar de hacerlo con proteínas purificadas. Las diluciones en serie de 16X de sobrenadantes de cultivos no-diluidos se incubaron con células que expresaban CD20 (WIL-2S) ó células que expresaban (CD28 CHO). La actividad de enlace en los sobrenadantes se comparó con las muestras de control que evaluaron el enlace del SMIP monoespecífico pertinente, tal como TRU-015, o 2e12 VLVH, o 2e12VHVL SMIP. El enlace en cada muestra se detectó con el empleo de anticuerpo anti-IgG humana proveniente de cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en una dilución de 1:100.

La **Figura 4** es un histograma que muestra el patrón de enlace de versiones purificadas por proteína A de las proteínas que se sometieron a ensayo en la Figura 3 con las células WIL2-S. "TRU015" es un SMIP específico para la molécula CD20. *También se analizaron dos proteínas de enlace multiespecíficas con función efectora.* "2H7-2E12 LH" tiene dominio de enlace 2, específico para la molécula CD28, en orientación V_L-V_H; "2H7-2E12 HL" tiene dominio de enlace 2, específico para la molécula CD28, en orientación V_H-V_L. Cada una de las proteínas se sometió a ensayo para determinar el enlace en un nivel de 5 μg/ml, y se detectó enlace con el anticuerpo anti-IgG humana proveniente de cabra conjugado con FITC en una proporción de 1:100. Ver la descripción previa de la Figura 2, donde se incluye una descripción más detallada de las moléculas sobre las cuales se hicieron los ensayos.

La **Figura 5** muestra dos histogramas de ilustran el enlace de las proteínas de enlace multiespecíficas purificadas por proteína A con función efectora a células CHO

que expresaban CD28. "2H7-2E12 LH" tiene dominio de enlace 2, específico para la molécula CD28, en orientación V_L-V_H; "2H7-2E12 HL" tiene dominio de enlace 2, específico para la molécula CD28, en orientación V_H-V_L. Cada una de las proteínas se sometió a ensayo para determinar el enlace en un nivel de 5 μg/ml, y se detectó enlace con el anticuerpo anti-IgG humana proveniente de cabra conjugado con FITC en una proporción de 1:100. Ver la descripción previa de la Figura 2, donde se incluye una descripción más detallada de las moléculas sobre las cuales se hicieron los ensayos.

La **Figura 6** A) muestra una tabla que identifica los ligadores que unen la subregión constante y el dominio de enlace 2. Los ligadores se identifican por nombre, secuencia, identificador de secuencia, longitud de secuencia y la secuencia de la fusión con el dominio de enlace 2. B) muestra una tabla donde se identifica una variedad de construcciones que identifican elementos de las moléculas ejemplificadas según la invención. Además de identificar las moléculas de enlace multivalentes por nombre, los elementos de aquellas moléculas se revelan en términos del dominio de enlace 1(BD1), la región subconstante (bisagra y dominio efector o EFD), un ligador (ver la Figura 6A, donde se brinda información adicional respecto de los ligadores), y el dominio de enlace 2 (BD2). Se suministran las secuencias de una cantidad de proteínas de enlace multivalentes de ejemplo, y se identifican en la figura por identificador de secuencia. Otras proteínas de enlace multivalentes tienen elementos, u órdenes de elementos, alterados, con alteraciones predecibles en la secuencia a partir de las secuencias reveladas.

La **Figura 7** muestra un gráfico de columnas compuesto que ilustra el enlace de proteínas purificadas en una concentración simple y fija a las moléculas CD20 que expresan las células WIL-2S y a células CHO que expresan CD28. "H1-H6" se refiere a las moléculas 2H7-sss-hIgG-Hx-2e12 con los ligadores H1-H6 y las regiones 2e12 V en la orientación de V_H-V_L. "L1-L6" se refiere a las moléculas 2H7-sss-hIgG-Lx-2e12 con los ligadores L1-L6 y las regiones 2e12 V en la orientación de V_L-V_H. Todas las

moléculas se sometieron a ensayo en una concentración de 0,72 μg/ml, y el enlace se detectó con el empleo de anticuerpo anti-IgG humana proveniente de cabra conjugado en FITC en una proporción de 1:100. La intensidad media de fluorescencia para cada muestra, luego, se trazó en forma gráficos de pares de barras para los dos tipos de células diana sometidas a ensayo, con respecto a cada una de las construcciones multivalentes sometidas a ensayo L1-L6 o H1-H6.

La **Figura 8** muestra fotografías de electroforesis sobre gel de poliacrilamida-SDS teñida con una solución de Coomassie, no-reductora y reductora. Estos geles muestran el efecto de la variante de secuencia / longitud del ligador en la proteína 2H7-sss-hIgG-Hx-2e12 HL sobre las cantidades de las dos bandas de proteínas predominantes visualizadas en el gel.

La **Figura 9** muestra el análisis por transferencia Western de las proteínas de fusión [2H7-sss-hIgG-H6-2e12], y los SMIP monoespecíficos relevantes se sondaron con (a) CD28mIgG o con (b) un Fab reactivo con especificidad 2H7. Los resultados muestran que la presencia del ligador H6 da como resultado la generación de formas clivadas de las construcciones multivalentes que carecen de la especificidad de enlace CD28.

La **Figura 10** muestra las curvas de enlace de las diferentes variantes del ligador para las formas del ligador [TRU015-sss-IgG-Hx-2e12 HL] H1-H6. El primer panel muestra las curvas de enlace para enlazarse a las moléculas CD20 que expresan las células WIL-2S. El segundo panel muestra las curvas de enlace para enlazar las diferentes formas a células CD28 CHO. Estas curvas de enlace se generaron con diluciones en serie de proteína de fusión purificada por proteína A, y el enlace se detectó con el uso de anticuerpo anti-IgG humana proveniente de cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en una dilución de 1:100.

La **Figura 11** muestra una tabla donde se resumen los resultados del fraccionamiento SEC de las proteínas de fusión multiespecíficas 2H7-sss-IgG-2e12 HL

con variantes de ligadores H1-H7. Cada línea de la tabla enumera una variante de ligador diferente de las proteínas de fusión [2H7-sss-IgG-Hx-2e12-HL]. El tiempo de retención del pico de interés (POI, *por su sigla en inglés*), y también se tabula el porcentaje de la proteína de fusión presente en el POI, y el porcentaje de proteína hallada en otras formas. También se lista el clivado de las moléculas, donde el grado de clivado está indicado en forma cualitativa, donde las cuatro opciones posibles son (Sí), Sí y SÍ o No.

La **Figura 12** muestra dos gráficos con curvas de enlace para las proteínas de fusión multiespecíficas [2H7-sss-hIgG-Hx-2e12] con ligadores variantes H3, H6, y ligadores H7 con las células que expresan CD20 ó CD28. Las diluciones en serie de las proteínas de fusión purificadas por proteína A de 10 μg/ml a 0,005 μg/ml se incubaron con células CD20 que expresaban WIL-2S o células CD28 CHO. El enlace se detectó con el empleo de anticuerpo anti-IgG humana proveniente de cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en una dilución de 1:100. El panel A muestra el enlace con las células WIL-2S, y el panel B muestra el enlace a las células CD28 CHO.

La **Figura 13** muestra los resultados de un ensayo de enlace alternativo, generado por las moléculas que se utilizan para la Figura 12. En este caso, las proteínas de fusión primero se enlazaron a moléculas CD20 que expresan WIL-2S, y luego se detectó el enlace con CD28mIgG (5 μg/ml) y reactivo anti-ratón FITC, en una proporción de 1:100. Estos resultados demuestran el enlace simultáneo tanto a CD20 como a CD28 en la misma molécula.

La **Figura 14** muestra los resultados obtenidos usando otra variante de construcción de fusión multiespecífica. En este caso, se hicieron modificaciones en la especificidad para BD2, de manera tal que las regiones V para el anticuerpo G28-1 se utilizaron para crear un dominio de enlace específico a CD37. Se muestran dos gráficos que ilustran la capacidad relativa de los anticuerpos CD20 y/o CD37 de bloquear el enlace de la proteína de fusión multiespecífica [2H7-sss-IgG-Hx-G28-1] a

células Ramos o BJAB, que expresan las dianas CD20 y CD37. Cada tipo de célula se preincubó con anticuerpo específico CD20 (25 μg/ml) o el anticuerpo específico CD37 (10 μg/ml) o ambos reactivos (se trata de reactivos anti-humanos provenientes de ratón), antes de la incubación con la proteína de fusión multiespecífica. El enlace de la proteína de fusión multiespecífica luego se detectó con reactivo de anticuerpo anti-IgG humana proveniente de cabra conjugado con FITC en una proporción de 1:100 (preadsorbida en ratón para eliminar la reactividad cruzada).

La **Figura 15** muestra los resultados de un ensayo ADCC realizado con células diana BJAB, células efectoras PBMC y con la proteína de fusión específica CD20-hIgG-CD37, a modo del reactivo de prueba. Para ver una descripción completa del procedimiento, remitirse al ejemplo adecuado. El gráfico traza la concentración de la proteína de fusión respecto del porcentaje de destrucción específica en cada dosis sometida a ensayo para los reactivos SMIP monoespecíficos, y para las variantes [2H7-sss-hIgG-STD1-G28-1] LH y HL. Cada serie de datos grafica los efectos de la respuesta a la dosis para una de estas proteínas de fusión monocatenarias monoespecíficas o multiespecíficas.

La **Figura 16** muestra una tabla donde se tabulan los resultados de un experimento de cultivo concurrente, donde las PBMC se cultivaron en la presencia de TRU 015, G28-1 SMIP, ambas moléculas juntas, o la variante [2H7-sss-IgG-H7-G28-1HL]. Las proteínas de fusión se utilizaron en un nivel de 20 μg/ml, y se incubaron durante 24 o 72 horas. Las muestras se tiñeron con anticuerpos CD3 conjugados con FITC, y con anticuerpos específicos CD19 o CD40 conjugados con PE, para luego someterse a citometría de flujo. Posteriormente se tabuló el porcentaje de células en cada compuerta.

La **Figura 17** muestra dos gráficos de columnas de los efectos sobre la apoptosis de la línea celular B después de 24 horas de incubación con la molécula [2H7-sss-hIgG-H7-G28-1 HL] o el control SMIP CD20 y/o CD37 monoespecífico, solo o en

combinación. El porcentaje de células positivas a anexina V-yoduro de propidio se diagramó como una función del tipo de reactivo de prueba utilizado para los experimentos de incubación concurrente. El panel A muestra los resultados obtenidos con el empleo de células Ramos, y el panel B muestra los correspondientes a las células Daudi. Cada SMIP dirigido a CD20 ó CD37 se muestra en las concentraciones indicadas, además si se utilizaron combinaciones de dos reactivos, la cantidad relativa de cada reactivo se muestra entre paréntesis. Para la proteína de fusión CD20-CD37 multiespecífica, se sometieron a ensayo las concentraciones de 5, 10 y 20 μg/ml.

La **Figura 18** muestra dos gráficos de las variantes de la molécula [2H7-hIgG-G19-4] y su enlace a las células que expresan CD3 (Jurkat) o células que expresan CD20 (WIL-2S). Las moléculas incluyen [2H7-sss-hIgG-STD1-G19-4 HL], LH, y [2H7-csc-hIgG-STD1-G19-4 HL]. Las proteínas de fusión purificadas por proteína A se titularon a partir de 20 μg/ml hasta los 0,05 μg/ml, y el enlace se detectó utilizando anticuerpo anti-IgG humana proveniente de cabra conjugado con FITC en una proporción de 1:100. La intensidad de fluorescencia media (MFI, *por su sigla en inglés*) se diagrama como una función de la concentración de proteínas.

La **Figura 19** muestra los resultados de los ensayos ADCC realizados con variantes de la molécula [2H7-hIgG-STD1-G19-4 HL] con una bisagra SSS o una bisagra CSC, células diana BJAB, y PBMC humana total como células efectoras o células NK aisladas de PBMC como células efectoras. La destrucción se midió como una función de la concentración de las proteínas de fusión multiespecíficas. La destrucción que se observó con estas moléculas se comparó con la que se observó con el empleo de G19-4, TRU 015, o una combinación de estos dos reactivos. Cada serie de datos diagrama un reactivo de prueba diferente, donde la destrucción específica porcentual se diagrama como una función de la concentración de proteínas.

La **Figura 20** presenta el porcentaje de linfocitos B Ramos que mostraron tinción positiva con anexina V (Ann) y/o yoduro de propidio (PI) después de la incubación

durante toda la noche con cada miembro de un panel de matriz de anticuerpos de los linfocitos B (2 µg/ml) en la presencia, o ausencia, de un anticuerpo anti-CD20 (presente en un nivel de 2 µg/ml, en los casos en que se agrega). El anticuerpo secundario anti-ratón proveniente de cabra siempre estaba presente en un cociente de concentración de dos veces respecto de otros anticuerpos (ya sea sólo el anticuerpo matriz, o el anticuerpo matriz y anticuerpo anti-CD20). Barras con rayas verticales: anticuerpo matriz (2 µg/ml) denotado en el eje de las X y anticuerpo anti-ratón proveniente de cabra (4 µg/ml). Barras con rayas horizontales: anticuerpo matriz (2 µg/ml) denotado en el eje de las X y anticuerpo anti-CD20 (2 µg/ml), y anticuerpo anti- ratón proveniente de cabra (4 µg/ml). La condición del segundo paso funcionó como un control e implicó el agregado de anticuerpo anti-ratón proveniente de cabra en un nivel de 4 µg/ml (barras con rayas verticales) o de 8 µg/ml (barras con rayas horizontales), sin un anticuerpo matriz o anticuerpo anti-CD20. "CL II" (MHC de clase II) en las figuras se refiere a un anticuerpo monoclonal con reactividad cruzada a HLA DR, DQ y DP, es decir, antígenos MHC de clase II.

La **Figura 21** presenta el porcentaje de linfocitos B Ramos que mostraron tinción positiva con anexina V (Ann) y/o yoduro de propidio (PI) después de la incubación durante toda la noche con cada miembro de un panel de matriz de anticuerpos de los linfocitos B (2 µg/ml) en la presencia, o ausencia, de un anticuerpo anti-CD79b (presente en un nivel de 0,5 µg/ml o 1 µg/ml, en los casos en que se agrega). Ver la descripción de la Figura 20 respecto de la identificación de muestras de "CL II" y del "segundo paso". Barras con rayas verticales: anticuerpo matriz (2 µg/ml) y anticuerpo anti-ratón proveniente de cabra (4 µg/ml); barras con rayas horizontales: anticuerpo matriz (2 µg/ml), anticuerpo anti-CD79b (1 µg/ml) y anticuerpo anti- ratón proveniente de cabra (6 µg/ml); barras punteadas: anticuerpo matriz (2 µg/ml), anticuerpo anti-CD79b (0,5 µg/ml) y anticuerpo anti-ratón proveniente de cabra (5 µg/ml).

La **Figura 22** presenta el porcentaje de linfocitos B Ramos que mostraron tinción positiva con anexina V (Ann) y/o yoduro de propidio (PI) después de la incubación durante toda la noche con cada miembro de un panel de matriz de anticuerpos de los linfocitos B (2 µg/ml) en la presencia, o ausencia, de un anticuerpo anti-CL II (presente en un nivel de 0,25 µg/ml o 0,5 µg/ml, en los casos en que se agrega). Ver la descripción de la Figura 20 respecto de la identificación de muestras de "CL II" y del "segundo paso". Barras con rayas verticales: anticuerpo matriz (2 µg/ml) y anticuerpo anti-ratón proveniente de cabra (4 µg/ml); barras con rayas horizontales: anticuerpo matriz (2 µg/ml), anticuerpo anti-CL II (0,5 µg/ml) y anticuerpo anti-ratón proveniente de cabra (5 µg/ml); barras punteadas: anticuerpo matriz (2 µg/ml), anticuerpo anti-CL II (0,25 µg/ml) y anticuerpo anti-ratón proveniente de cabra (4,5 µg/ml).

La **Figura 23** presenta el porcentaje de linfocitos B DHL-4 que mostraron tinción positiva con anexina V (Ann) y/o yoduro de propidio (PI) después de la incubación durante toda la noche con cada miembro de un panel de matriz de anticuerpos de los linfocitos B (2 µg/ml) en la presencia, o ausencia, de un anticuerpo anti-CD22 (presente en un nivel de 2 µg/ml, en los casos en que se agrega). Ver la descripción de la Figura 20 respecto de la identificación de muestras de "CL II" y del "segundo paso". Barras sólidas: anticuerpo matriz (2 µg/ml) y anticuerpo anti-ratón proveniente de cabra (4 µg/ml); barras inclinadas: anticuerpo matriz (2 µg/ml), anticuerpo anti-CD22 (2 µg/ml) y anticuerpo anti-ratón proveniente de cabra (8 µg/ml).

La **Figura 24** proporciona un gráfico donde se muestra la inhibición directa del crecimiento de las líneas celulares de linfoma Su-DHL6 (triángulos) y DoHH2 (cuadrados) mediante SMIP CD20 libre (símbolos cerrados) o CD20xCD20 de escorpión monoespecífico (símbolos abiertos).

La **Figura 25** es un gráfico donde se muestra la inhibición directa del crecimiento de las líneas celulares de linfoma Su-DHL-6 (triángulos) y DoHH2 (cuadrados) mediante

SMIP anti-CD37 libre (símbolos cerrados) o anti-CD37 de escorpión monoespecífico (símbolos abiertos).

La **Figura 26** presenta un gráfico donde se muestra la inhibición directa del crecimiento de las líneas celulares de linfoma Su-DHL-6 (triángulos) y DoHH2 (cuadrados) mediante una combinación de dos SMIP monoespecíficos (símbolos cerrados) o mediante un CD20-CD37 de escorpión biespecífico (símbolos abiertos).

La **Figura 27** es un gráfico que revela la inhibición directa del crecimiento de las líneas celulares de linfoma Su-DHL-6 (triángulos) y WSU-NHL (cuadrados) mediante una combinación de SMIP CD20 libre y SMIP CD37 (símbolos cerrados) o CD20xCD37 de escorpión biespecífico (símbolos abiertos).

La **Figura 28** proporciona histogramas que muestran los efectos del ciclo celular de escorpiones. Las muestras de las células de linfoma DoHH2 se dejaron sin tratar en forma independiente, se trataron con SMIP 016 o se trataron con CD37 x CD37 de escorpión monoespecífico. Barras sin relleno: fase sub-G_1 del ciclo celular; barras negras: fase G_0/G_1; barras sombreadas: fase S; y barras rayadas: fase G_2/M.

La **Figura 29** presenta gráficos de los datos que establecen que el tratamiento de las células de linfoma con escorpiones dio como resultado un aumento de la capacidad de señalización en comparación con los SMIP libre, medido por el flujo de iones de calcio.

La **Figura 30** proporciona gráficos que demuestran la citotoxicidad de células dependientes de escorpión.

La **Figura 31** muestra gráficos de datos que indican que los escorpiones median la citotoxicidad dependiente del complemento.

La **Figura 32** proporciona datos en forma gráfica, que muestran un ensayo ELISA comparativo del enlace de un SMIP y un escorpión con isoformas de baja (B) y alta afinidad (A) de FcγRIII (CD16).

La **Figura 33** presenta gráficos que establecen el enlace de un SMIP y un escorpión con alelotipos de baja (A) y alta (B) afinidad de FcγRIII (CD16) en la presencia de células diana.

La **Figura 34** es un histograma que muestra el nivel de expresión de un CD20 x CD20 de escorpión en dos experimentos (matraz 1 y matraz 2), en seis condiciones de cultivo diferentes. Barras negras sólidas: matraz 1; barras vacías: matraz 2.

La **Figura 35** proporciona un histograma que muestra el rendimiento de la producción de un CD20 x CD20 de escorpión.

La **Figura 36** presenta geles SDS-PAGE (en condiciones reductoras y no-reductoras) de un SMIP y un escorpión.

La **Figura 37** proporciona un gráfico que muestra que los escorpiones retienen la capacidad de enlazarse a las células diana. Cuadrados rellenos: SMIP CD20; triángulos rellenos: SMIP CD37; círculos rellenos: SMIP CD20 (2Lm20-4) humanizados; diamantes abiertos: CD37 x CD37 de escorpión monoespecífico; cuadrados abiertos: CD20 x CD37 de escorpión biespecífico; y triángulos abiertos: CD20 (2Lm20-4) humanizado x CD20 (2Lm20-4) humanizado de escorpión.

La **Figura 38** contiene gráficos que muestran los resultados de ensayos de enlace competitivos que establecen que los dominios de enlace de escorpión del extremo N terminal y del extremo C terminal participan en el enlace de la célula diana.

La **Figura 39** presenta datos en forma de gráficos que muestran que los escorpiones tienen constantes de disociación más bajas que el SMIP.

La **Figura 40** muestra un gráfico que establece que los escorpiones son estables en suero *in vivo*, caracterizado por una semivida circulante sostenida reproducible para el escorpión.

La **Figura 41** proporciona un gráfico de respuesta a la dosis para CD20 x CD37 de escorpión biespecífico, que demuestra la eficacia *in vivo* de la administración de escorpión.

La **Figura 42** muestra el enlace de los linfocitos B diana por parte de una CD20xCD20 de escorpión monoespecífico (S0129) y glicovariantes.

La **Figura 43** proporciona gráficos que ilustran CD20xCD20 de escorpión (madre y glicovariantes) que inducen la destrucción mediada por ADCC de linfocitos B BJAB.

La **Figura 44** muestra un gel que revela los efectos sobre la estabilidad del escorpión producto de cambios en el ligador de escorpión, incluso los cambios de secuencia de ese ligador y que la extensión del ligador agregando una secuencia H7 al ligador, indicado por una "+" en la línea H7 debajo del gel.

La **Figura 45** muestra el enlace a las células WIL2S de una CD20xCD20 de escorpión (S0129) y sus variantes de ligador de escorpión.

La **Figura 46** muestra la destrucción directa de células de una variedad de linfocitos B por parte de la CD20xCD20 de escorpión y de la SMIP CD20.

La **Figura 47** revela la destrucción directa de líneas de linfocitos B adicionales por parte de la CD20xCD20 de escorpión monoespecífico.

La **Figura 48** muestra las capacidades de destrucción directa de células de cada uno de dos escorpiones monoespecíficos, es decir CD20xCD20 y CD37xCD37; y un CD20xCD37 de escorpión biespecífico, éste último exhibe una forma diferente de curva de destrucción.

La **Figura 49** indica gráficamente la respuesta de las células Su-DHL-6 B a cada uno de un CD20xCD20 (S0129), un CD37xCD37, y un CD20xCD37 de escorpión.

La **Figura 50** muestra la capacidad de CD19xCD37 de escorpión biespecífico y Rituxan® para destruir directamente los linfocitos B Su-DHL-6.

La **Figura 51** proporciona histogramas que muestran la destrucción directa de los linfocitos B DHL-4 mediante una variedad de escorpiones que se enlazan a CD20 y SMIP, al igual que Rituxan®, según se indica en la figura. Barras azules: células vivas; barras marrones sobre la derecha de cada par: anexina+/PI+.

La **Figura 52** proporciona una representación gráfica de la destrucción directa de varios escorpiones que se enlazan a CD20 y SMIP, al igual que Rituxan®, según se indica en la figura.

La **Figura 53** proporciona gráficos de la actividad ADCC inducida por varios escorpiones que se enlazan a CD20 y SMIP, según se indica en la figura, al igual que Rituxan®.

La **Figura 54** proporciona gráficos de la actividad CDC inducida por varios escorpiones que se enlazan a CD20 y SMIP, según se indica en la figura, al igual que Rituxan®.

La **Figura 55** brinda histogramas que muestran los niveles de enlace de C1q con escorpiones que se enlazan a CD20 unidos a células B Ramos.

La **Figura 56** brinda gráficos de dispersión de análisis FACS que muestran la pérdida del potencial de membrana mitocondrial que se atribuye a escorpiones que se enlazan a CD20 (2Lm20-4x2Lm20-4 y 011x2Lm20-4) y Rituxan®, respecto de los controles (panel superior); los histogramas del porcentaje de células con disminución del potencial de membrana mitocondrial [MMP (*por su sigla en inglés*) disminuido: barras negras], se muestran en el panel inferior.

La **Figura 57** incluye histogramas que muestran la falta relativa de la actividad de la caspasa 3 mediante escorpiones que se enlazan a CD20 (2Lm20-4x2Lm20-4 y 011x2Lm20-4), Rituximab, CD95 y controles.

La **Figura 58** brinda un compuesto de cuatro análisis por transferencia Western de poli (ADP-ribosa) polimerasa y caspasas 3, 7 y 9 a partir de linfocitos B que

muestran escasa degradación de cualquiera de estas proteínas atribuible a escorpiones que se enlazan a CD20 que se unen a los linfocitos.

La **Figura 59** es un electroforetograma en gel de ADN cromosómico de linfocitos B que muestra el grado de fragmentación atribuible a escorpiones que se enlazan a CD20 que se unen a las células.

La **Figura 60** es un elecroforetograma en gel de inmunoprecipitados obtenidos con cada uno de los anticuerpos anti-fosfotirosina y un anticuerpo anti-SYK. Los inmunoprecipitados se obtuvieron a partir de lisados de linfocitos B puestos en contacto con escorpiones que se enlazan a CD20, según se indica en la figura.

La **Figura 61** proporciona gráficos del índice de combinaciones de escorpiones que se enlazan a CD20 en tratamientos concurrentes con cada una de doxorubicina, vincristina y rapamicina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona composiciones de péptidos relativamente pequeños que tienen al menos dos regiones o dominios de enlace, que pueden proporcionar una o más especificidades de enlace, derivadas de los dominios de enlace variables de las inmunoglobulinas, tales como anticuerpos, dispuestos en posición terminal en relación con un dominio efector que comprende al menos parte de una región constante de inmunoglobulina (es decir, una fuente de la cual puede derivarse una subregión constante, como se define aquí), así como los ácidos nucleicos, los vectores y las células hospedante involucradas en la producción recombinante de tales péptidos; y métodos para usar las composiciones de péptidos en una variedad de aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas, incluido el tratamiento de un trastorno así como el alivio de, al menos, un síntoma de dicho trastorno. Las composiciones de péptidos disponen ventajosamente un segundo dominio de enlace en el extremo C terminal al dominio efector, una disposición que, sorprendentemente, proporciona enlace sin impedimento estérico o con menor impedimento, mediante al menos dos

dominios de enlace del péptido, mientras retienen una función o funciones efectoras del dominio efector dispuesto en forma central.

Los dominios de enlace primero y segundo de los péptidos multivalentes, según la invención, pueden ser iguales (es decir, tener secuencias de aminoácidos idénticas o sustancialmente idénticas y ser monoespecíficos) o diferentes (y ser multiespecíficos). Aunque sean diferentes en cuanto a la estructura primaria, los dominios de enlace primero y segundo pueden reconocer y enlazarse al mismo epítopo de una molécula diana y, por consiguiente, serían monoespecíficos. En muchos casos, sin embargo, los dominios de enlace diferirán estructuralmente y se enlazarán a diferentes sitios de enlace, dando lugar a una proteína multivalente y multiespecífica. Esos diferentes sitios de enlace pueden existir en una única molécula diana o en diferentes moléculas diana. En el caso de las dos moléculas de enlace que reconocen diferentes moléculas diana, esas moléculas diana pueden existir, por ejemplo, sobre o en la misma estructura (por ejemplo, la superficie de la misma célula), o aquellas moléculas diana pueden existir sobre o en estructuras o lugares separados. Por ejemplo, una proteína de enlace multiespecífica según la invención puede tener dominios de enlace que se enlazan específicamente a la molécula diana en las superficies de distintos tipos de células. Alternativamente, un dominio de enlace puede enlazarse específicamente a una diana en una superficie celular y el otro dominio de enlace puede enlazarse específicamente a una diana que no se encuentra asociada con una célula, tal como una proteína extracelular estructural (matriz) o una proteína libre (por ejemplo, soluble o estrómica).

Los dominios de enlace primero y segundo se derivan de una o más regiones de las mismas o diferentes estructuras proteicas de inmunoglobulina, tal como las moléculas del anticuerpo. El primer y/o segundo dominio de enlace puede presentar una secuencia idéntica a la secuencia de una región de una inmunoglobulina, o puede ser una modificación de dicha secuencia para proporcionar, por ejemplo, propiedades de enlace alteradas o estabilidad alterada. Dichas modificaciones se conocen en el arte

e incluyen alteraciones en la secuencia de aminoácidos que contribuyen directamente a la propiedad alterada, tal como enlace alterado, por ejemplo al llevar hacia una estructura alterada secundaria o de un orden para el péptido. También se contemplan las secuencias de aminoácidos modificadas, que son resultado de la incorporación de aminoácidos no-naturales, como los aminoácidos convencionales no-naturales, los aminoácidos no-convencionales y los ácidos imino. En algunas formas de realización, la secuencia alterada da lugar al procesamiento alterado postranslational, por ejemplo que lleva a un modelo patrón de glicosilación alterado.

Cualquiera de una variedad amplia de dominios de enlace derivados de una inmunoglobulina o polipéptido similar a inmunoglobulina (por ejemplo, un receptor) se contempla para su empleo en escorpiones. Los dominios de enlace derivados de los anticuerpos comprenden las regiones CDR de un dominio V_L y un dominio V_H, visto, por ejemplo, en el contexto de usar un dominio de enlace de un anticuerpo humanizado. Los dominios de enlace comprenden dominios V_L y V_H completos derivados de un anticuerpo pueden organizarse en cualquiera de las orientaciones. Un escorpión según la invención puede tener cualquiera de los dominios de enlace aquí descriptos. Para los escorpiones que tienen al menos un dominio de enlace que reconoce un linfocito B, los escorpiones de ejemplo tienen, al menos, un dominio derivado de CD3, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD38, CD39, CD40, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD78, CD79a/b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD89, CD98, CD126, CD127, CDw130, CD138 o CDw150. En algunas formas de realización, el escorpión es una proteína de enlace multivalente, que comprende al menos un dominio de enlace que tiene, como mínimo, un dominio de enlace con una secuencia que se selecciona del grupo que consta de las SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 103, 105, 107 y 109. En algunas formas de realización, un escorpión comprende un dominio de enlace que incluye una secuencia que se selecciona del grupo que consta de cualquiera de las SEQ ID NOS: 332-345. En algunas formas de realización, un

escorpión comprende un dominio de enlace que incluye una secuencia derivada de los dominios V_L y V_H de inmunoglobulina, donde la secuencia se selecciona del grupo que consta de cualquiera de las SEQ ID NOS: 355-365. La invención también comprende escorpiones que incluyen un dominio de enlace que tiene la orientación opuesta de V_L y V_H, con secuencias deducibles de cualquiera de las SEQ ID NOS: 355-365.

Para las formas de realización donde cualquiera, o ambos, de los dominios de enlace derivan de más de una región de una inmunoglobulina (por ejemplo, una región V_L de Ig y una región V_H de Ig), la pluralidad de regiones puede unirse mediante un péptido ligador. Del mismo modo, se puede utilizar un ligador para unir el primer dominio de enlace a una subregión constante. La unión de la subregión constante a un segundo dominio de enlace (es decir, el enlace del dominio 2 dispuesto hacia el extremo C terminal de un escorpión), se logra mediante un ligador de escorpión. Con preferencia, estos ligadores de escorpión tienen entre 2 y 45 aminoácidos, o entre 2 y 38 aminoácidos o entre 5 y 45 aminoácidos. Por ejemplo, el ligador H1 tiene una longitud de 2 aminoácidos y el ligador STD2 tiene una longitud de 38 aminoácidos. Más allá de las consideraciones generales sobre longitud, una región ligadora de escorpión apropiada para uso en los escorpiones según la invención incluye una región de bisagra del anticuerpo, que se selecciona del grupo que consta de las bisagras IgG, la IgA, IgD e IgE y sus variantes. Por ejemplo, el ligador de escorpión puede ser una región de bisagra del anticuerpo que se selecciona del grupo que consta de IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana, IgG4 humana y sus variantes. En algunas formas de realización, la región ligadora de escorpión tiene un único residuo cisteína para la formación de un enlace de disulfuro intercatenario. En otras formas de realización, el ligador de escorpión tiene dos residuos cisteína para la formación de los enlaces de disulfuro intercatenarios. En algunas formas de realización, una región ligadora de escorpión se deriva de una región de bisagra de inmunoglobulina o una región tallo de C-lectina y comprende una secuencia seleccionada del grupo que consta

de las SEQ ID NOS: 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 287, 289, 297, 305, 307, 309, 310, 311, 313, 314, 315, 316,317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 346, 351, 352, 353, 354, 373, 374, 375, 376 y 377. De manera más general, se contempla cualquier secuencia de aminoácidos identificada en la lista de secuencias como que proporciona una secuencia derivada de una región de bisagra que se usa como un ligador de escorpión en las moléculas de escorpión según la invención. Además, un ligador de escorpión derivado de una bisagra de Ig es un dominio peptídico similar a bisagra que tiene al menos un cisteína libre capaz de participar en un enlace de disulfuro intercatenario. Preferentemente, un ligador de escorpión derivado de un péptido de bisagra de Ig retiene una cisteína que corresponde a la cisteína de bisagra dispuesta hacia el extremo N terminal de esa bisagra. Preferentemente, un ligador de escorpión derivado de una bisagra de IgG1 tiene una cisteína o tiene dos cisteínas correspondientes a las cisteínas de bisagra. Además, un ligador de escorpión es una región tallo de una molécula de C-lectina de tipo II. En algunas formas de realización un escorpión comprende un ligador de escorpión que tiene una secuencia que se selecciona del grupo que consta de las SEQ ID NOS: 373-377.

La subregión constante dispuesta en forma central se deriva de una región constante de una proteína de inmunoglobulina. La subregión de la constante en general se deriva de una porción C_{H2} de una región C_H de una inmunoglobulina en abstracto, aunque puede derivarse de una porción C_{H2}- C_{H3}. Optativamente, la subregión constante puede derivarse de una porción bisagra-C_{H2} o bisagra-C_{H2}-C_{H3} de una inmunoglobulina, colocando un péptido correspondiente a una región de bisagra de la Ig del extremo N terminal respecto de la subregión constante, y que se dispone entre la subregión constante y el dominio de enlace 1. Además, las porciones de la subregión

constante pueden derivarse de las regiones C_H de diferentes inmunoglobulinas. Aún más, el péptido correspondiente a un CH3 de Ig puede estar truncado, dejando una secuencia de aminoácidos del extremo C terminal seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID NOS: 366-371. Se prefiere, sin embargo, que en las formas de realización en las cuales una bisagra de escorpión es un péptido similar a bisagra derivado de una bisagra de inmunoglobulina, que el ligador de escorpión y la subregión constante deriven del mismo tipo de inmunoglobulina. La subregión constante proporciona al menos una actividad asociada con una región C_H de una inmunoglobulina, como la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), enlace a la proteína A, enlace a al menos un receptor F_C, estabilidad reproduciblemente detectable en relación con una proteína según la invención, salvo la ausencia de una subregión constante, y quizás la transferencia placentaria donde sería ventajosa la transferencia generacional de una molécula según la invención, como es reconocido por el experto en el arte. Del mismo modo que los dominios de enlace descriptos previamente, la subregión constante deriva de, al menos, una molécula de inmunoglobulina y presenta una secuencia de aminoácidos idéntica o sustancialmente idéntica a una región o regiones de una inmunoglobulina, como mínimo. En algunas formas de realización, la subregión constante se modifica respecto de la secuencia o las secuencias de, al menos, una inmunoglobulina (mediante la sustitución de uno o más aminoácidos o iminoácidos convencionales o no-convencionales no-naturales, por ejemplo, sintéticos), dando lugar a una estructura primaria que puede producir una estructura alterada secundaria -o de un orden mayor- con propiedades alteradas asociadas, o puede conducir a las alteraciones en el procesamiento postranslational, tal como glicosilación.

Para esos dominios y subregiones constantes de enlace que presentan una secuencia de aminoácidos idéntica o sustancialmente idéntica a uno o más polipéptidos de inmunoglobulina, las modificaciones postranslationales de la molécula según la

invención pueden dar lugar a una molécula modificada en relación con la o las inmunoglobulinas que sirven como base para la modificación. Por ejemplo, usando las técnicas conocidas en el arte, una célula hospedante puede modificarse, por ejemplo una célula CHO, de una manera que conduzca a un patrón de glicosilación de polipéptido alterado en relación con ese polipéptido en una célula hospedante no modificada (por ejemplo, CHO).

Gracias a tales moléculas y a los métodos para producirlas en forma recombinante *in vivo*, se abrieron nuevos rumbos para los medios de diagnóstico y los tratamientos terapéuticos orientados para permitir, por ejemplo, el reclutamiento de células efectoras del sistema inmunitario (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos, células asesinas naturales, y demás) orientado a células, tejidos, agentes y objetos extraños para ser destruidos o secuestrados, tal como células cancerosas y agentes infecciosos. Además de localizar las células terapéuticas en un sitio de tratamiento, los péptidos son útiles para la localización de los compuestos terapéuticos, como las proteínas radiomarcadas. Aún más, los péptidos son también útiles para depurar composiciones nocivas, por ejemplo al asociar una composición nociva, como una toxina, con una célula capaz de destruir o eliminar esa toxina (por ejemplo, un macrófago). Las moléculas de la invención son útiles para la modulación de la actividad de enlazar las moléculas compañeras, como los receptores de la superficie celular. Esto se muestra en la Figura 17 donde la señalización apoptótica mediante CD20 y/o CD37 es mejorada notablemente por una molécula de la presente invención. El efecto de esta señalización es la muerte de la célula orientada. Las enfermedades y las afecciones donde es beneficiosa la eliminación de las poblaciones celulares definida, incluyen enfermedades infecciosas y parasitarias, afecciones inflamatorias y auto-inmunitarias, neoplasias malignas y demás similares. El experto en el arte reconocerá que el enfoque no presenta limitaciones en cuanto al mejoramiento de la señalización apoptótica. La señalización mitótica y la señalización que conduce a la diferenciación, activación o

inactivación de las poblaciones definidas de células, puede ser inducida por las moléculas de la presente invención mediante la selección apropiada moléculas compañeras de enlace. Se facilitará el análisis más detallado de la revelación de la invención gracias a las siguientes definiciones expresas de los términos empleados en la presente.

Una "proteína de enlace monocatenaria" es una disposición simple y contigua de aminoácidos enlazados de manera covalente, donde la cadena es capaz de enlazarse específicamente a uno o más compañeros de enlace, que comparte suficientes determinantes de un sitio de enlace que se unirá detectablemente mediante la proteína de enlace monocatenaria. Los ejemplos de compañeros de enlace incluyen proteínas, carbohidratos, lípidos y moléculas pequeñas.

Para facilitar la exposición, los "derivados" y las "variantes" de las proteínas, los polipéptidos y los péptidos según la invención se describen en términos de diferencias de las proteínas y/o los polipéptidos y/o los péptidos según la invención, lo cual significa que los derivados y las variantes, que son proteínas/polipéptidos/péptidos según la invención, son diferentes de las proteínas, los polipéptidos o los péptidos no-derivadas o no-variantes de la invención, tal como se definió. El experto en el arte entenderá que los derivados y las variantes en sí mismas son las proteínas, los polipéptidos y los péptidos según la invención.

Al término "anticuerpo" se le asigna la más amplia definición en coincidencia con su significado en el arte e incluye las proteínas, los polipéptidos y los péptidos capaces de enlazarse al menos a un compañero de enlace, como un antígeno proteináceo o no-proteináceo. Un "anticuerpo", tal como se lo usa aquí, incluye miembros de la superfamilia de inmunoglobulina de las proteínas, de cualquier especie, de la composición mono o multicatenaria y las variantes, los análogos, los derivados y los fragmentos de tales moléculas. Específicamente, un "anticuerpo" incluye cualquier forma de anticuerpo conocido en el arte, incluyendo sin carácter limitativo, los

anticuerpos monoclonales y policlonales, los anticuerpos quiméricos, los anticuerpos injertados por CDR, los anticuerpos humanizados, los fragmentos variables monocatenarios, los anticuerpos biespecíficos, los fragmentos bivalentes (diabodies), las fusiones de anticuerpos, y demás.

Un "dominio de enlace" es una región peptídica, como un fragmento de un polipéptido derivado de una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo), que específicamente se enlaza a uno o más compañeros de enlace más específicos. Si existe una pluralidad de compañeros de enlace, esos compañeros comparten los factores determinantes de enlace suficientes para enlazarse detectablemente al dominio de enlace. Preferentemente, el dominio de enlace es una secuencia contigua de aminoácidos.

En la presente, se asigna a "epítopo" su significado ordinario de un único sitio antigénico, es decir, un determinante antigénico, en una sustancia (por ejemplo, una proteína) con la cual interactúa específicamente un anticuerpo, por ejemplo mediante enlace. Otros términos que han adquirido significados bien establecidos en la técnica de las inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpo), tales como "región ligera variable," "región pesada variable", "región ligera constante," "región pesada constante", "región de bisagra del anticuerpo", "región determinante de complementariedad", "región de entramado", "isotipo del anticuerpo", "región F_C", "fragmento variable monocatenario" o "scFv", "fragmento bivalente", "quimera", "anticuerpo injertado por CDR", "anticuerpo humanizado", "anticuerpo configurado", "fusión de anticuerpos" y similares, reciben el significo consolidado en el arte, a menos que se indique aquí expresamente lo contrario.

Los términos comprendidos por los expertos en el arte en referencia a la tecnología de anticuerpos tienen el significado adquirido en el arte, a menos que expresamente se los defina en la presente. Ejemplos de tales términos son "V_L" y "V_H", en referencia a la región de enlace variable derivada de una cadena ligera y pesada de anticuerpos, respectivamente; y C_L y C_H, en referencia a una "región constante de

inmunoglobulina," es decir, una región constante derivada de una cadena ligera o pesada del anticuerpo, respectivamente, donde se entiende que la última región también se puede dividir en los dominios de la región constante C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} y C_{H4}, según el isotipo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) del cual se derivó la región. CDR significa "región determinante de la complementariedad". Una "región de bisagra"" deriva de la secuencia de aminoácidos interpuesta entre -y que conecta- las regiones C_{H1} y C_{H2} de una única cadena de un anticuerpo, que se conoce en el arte porque proporciona flexibilidad, en forma de una "bisagra," a los anticuerpos enteros.

Una "subregión constante" es un término definido aquí para hacer referencia a un péptido, polipéptido o secuencia proteica que corresponde a -o deriva de- uno o más dominios de la región constante de un anticuerpo. Por lo tanto, una subregión constante puede incluir cualquiera o todos los siguientes dominios: un dominio C_{H1}, una región de bisagra, un dominio C_{H2}, un dominio C_{H3} (IgA, IgD, IgG, IgE e IgM), y un dominio C_{H4} (IgE, IgM). Una subregión constante como se define aquí, por consiguiente, puede referirse a una región del polipéptido correspondiente a toda una región constante de un anticuerpo, o una porción de ésta. De manera característica, una subregión constante de un polipéptido, o el ácido nucleico codificante, de la invención tiene una bisagra, un dominio C_{H2}, y un dominio C_{H3}.

Una "función efectora" es una función asociada con -o proporcionada por- una región constante de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras incluyen citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC, *por su sigla en inglés*), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), enlace con el receptor F_C y semivida más prolongada de plasma, así como la transferencia placentaria. Una función efectora de una composición según la invención es detectable; preferentemente, la actividad específica de la composición según la invención para esa función es prácticamente idéntica a la actividad específica de un anticuerpo de tipo silvestre en lo que se refiere a esa función efectora, es decir, la subregión constante de

la molécula de enlace multivalente preferentemente no ha perdido ninguna función efectora en relación con un anticuerpo de tipo silvestre.

Un "ligador" es un péptido, o polinucleótido, que une o enlaza otros péptidos o polinucleótidos. De manera característica, un ligador peptídico es un oligopéptido de aproximadamente 2 a 50 aminoácidos, con ligadores polinucleótidos característicos que codifican un ligador de peptídico y, por lo tanto, tiene una longitud de 6 a150 nucleótidos, aproximadamente. Los ligadores unen el primer dominio de enlace a un dominio de la subregión constante. Un ligador de péptido de ejemplo es $(Gly_4Ser)_3$. Un ligador de escorpión se usa para unir el extremo C terminal de una subregión constante a un segundo dominio de enlace. El ligador de escorpión puede derivarse de una región de bisagra de inmunoglobulina o de la región de tallo de una C-lectina de tipo II, según se describe con mayor grado de detalle más adelante.

Al término "diana" se le da más de un significado, y es el contexto de uso el que define un significado no ambiguo en cada caso. En su sentido más estrecho, una "diana" es un sitio de enlace, es decir, el dominio de enlace de un compañero de enlace para una composición de péptidos según la invención. En un sentido más amplio, "diana" o "diana "molecular" se refiere a todo el compañero de enlace (por ejemplo, una proteína), que presenta necesariamente el sitio de enlace. A cada diana específica, como "CD20", "CD37" y similares, se asigna el significado ordinario que el término ha adquirido en el arte. Una "célula diana" es cualquier célula procariota o eucariota, ya sea sana o enferma, que se asocia con una molécula diana según la invención. Desde luego, las moléculas diana tampoco se encuentran asociadas con cualquier célula (es decir, una diana acelular) o asociadas con otras composiciones, tales como los virus (incluido el bacteriófago), portadores moleculares diana orgánicos o inorgánicos y los objetos extraños.

Los ejemplos de los materiales con los cuales puede asociarse una molécula diana incluyen células autólogas (por ejemplo, células cancerosas u otras células

enfermas), los agentes infecciosos (por ejemplo, células infecciosas y virus infecciosos), y demás. Una molécula diana puede asociarse con una célula enucleada, una membrana celular, un liposoma, una esponja, un gel, una cápsula, un comprimido y similares, que pueden usarse para suministrar, transportar o localizar una molécula diana, independientemente del uso concebido (por ejemplo, para el tratamiento médico, como resultado de la provisión benigna o no-intencional, o para impulsar una amenaza bioterrorista). "Acelular", "avírico", "sin portador", "sin objeto", y demás, se refieren a las moléculas diana que no se asocian con la composición o el material específico.

La "afinidad de enlace" se refiere a la fuerza del enlace no-covalente de las composiciones de péptidos de la invención y sus compañeros de enlace. Preferentemente, la afinidad de enlace se refiere a una medida cuantitativa de la atracción entre los miembros de un par de enlace.

Un "coadyuvante" es una sustancia que aumenta o beneficia el efecto funcional de un compuesto con el cual está asociado, como en forma de una composición farmacéutica que comprende un agente activo y un coadyuvante. Un "excipiente" es una sustancia inerte usada como diluyente al formular una composición farmacéutica. Un "portador" es una sustancia típicamente inerte usada para proporcionar un vehículo para suministrar una composición farmacéutica.

El término "célula hospedante" se refiere a cualquier célula, procariota o eucariota, en la cual se encuentra un polinucleótido, proteína o péptido según la invención.

"Introducir" un ácido nucleico o polinucleótido en un medio de células hospedante que prevé la entrada del ácido nucleico o polinucleótido en esa célula por cualquier medio conocido en el arte, incluso sin carácter limitativo, las precipitaciones mediadas por sal *in vitro* y otras formas de transformación de ácido nucleico/polinucleótido desnudo o ácido nucleico/polinucleótido transmitido por vector, infección y

optativamente transducción mediada por virus, con o sin una molécula "auxiliar", el suministro de proyectiles balísticos, la conjugación, y demás.

"Incubar" una célula hospedante significa mantener esa célula en condiciones ambientales conocidas en el arte para que se adecue a una finalidad dada, como la expresión de genes. Tales condiciones, incluida la temperatura, la fuerza iónica, la tensión de oxígeno, la concentración de dióxido de carbono, la composición nutricional, y cosas por el estilo, son bien conocidas en el arte.

"Aislar" un compuesto, como una proteína o péptido según la invención, significa separar ese compuesto de, al menos, un compuesto diferente con el cual se encuentra asociado en la naturaleza, como en una célula hospedante que expresa el compuesto a ser aislado, por ejemplo, aislando el medio de cultivo agotado que contiene el compuesto de las células hospedantes crecidas en ese medio.

Un "organismo que necesita" es cualquier organismo que corre el riesgo de padecer -o padece- algún trastorno, enfermedad o afección que es susceptible de tratarse o mejorarse con una composición según la invención, incluyendo sin carácter limitativo cualquiera de las diversas formas de cáncer, cualquiera de algunas de enfermedades auto-inmunitarias, la intoxicación por radiación debida a proteínas, péptidos y compuestos similares radiomarcadas, toxinas ingeridas o producidas internamente, y similares, que podrán apreciarse cuando se analice toda la revelación. Preferentemente, un organismo que necesita/en necesidad es un paciente humano.

El "alivio" de un síntoma de un una enfermedad significa reducir detectablemente la gravedad de ese síntoma de la enfermedad, según se conoce en el arte. Los ejemplos de síntomas incluyen dolor, calor, hinchazón y rigidez de las articulaciones.

A menos que quede claro a partir del contexto, los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido"" se usan indistintamente aquí, con cada uno referente a una cadena contigua de aminoácidos, como mínimo. Análogamente, los términos "polinucleótido", "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" se usan indistintamente, a menos que

87

quede claro a partir del contexto que se concibe un significado particular y no intercambiable.

"Sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales de los compuestos de la presente invención derivadas de la combinación de tales compuestos y un ácido orgánico o inorgánico (sales ácidas de adición) o una base orgánica o inorgánica (sales básicas de adición).

Con el uso de los términos definidos anteriormente, a continuación se proporciona una descripción general de los diversos aspectos de la invención. Después de la descripción general, se presentan ejemplos de aplicación para aportar las pruebas complementarias de la operabilidad y la utilidad de la invención revelada aquí.

Proteínas y polipéptidos

En ciertas formas de realización de la invención, se proporciona cualquiera de las proteínas de enlace multivalentes aquí descriptas con función efectora, incluso proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de enlace, en que la proteína de enlace multivalente o el péptido con función efectora comprende dos o más secuencias de polipéptidos del dominio de enlace. Cada una de las secuencias de polipéptidos del dominio de enlace es capaz de enlazarse o enlazarse específicamente a una o más dianas, tal como uno o más antígenos, y dichas dianas o dichos antígenos pueden ser iguales o pueden ser diferentes. La secuencia de polipéptidos del dominio de enlace puede derivarse de una región de la variable de antígeno o puede derivarse de las moléculas similares a inmunoglobulina, por ejemplo, los receptores que se pliegan de manera que imitan las moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos de los cuales se derivan los dominios de enlace pueden ser anticuerpos que son policlonales, incluso policlonales monoespecíficos, (mAb) monoclonales, recombinantes, quiméricos, humanizados (como CDR-injertado), humanos, monocatenarios, catalíticos y cualquier otra forma de anticuerpo conocido en el arte, así como sus fragmentos, variantes o derivados. En algunas formas de realización, cada uno de los dominios de enlace de la

proteína según la invención se deriva de una región variable completa de una inmunoglobulina. En las formas de realización preferidas, cada dominio de enlace se basa en una región variable de la Ig humana. En otras formas de realización, la proteína se deriva de un fragmento de una región variable de la Ig. En tales formas de realización, se prefiere que cada secuencia de polipéptidos del dominio de enlace corresponda a las secuencias de cada una de las regiones determinantes de la complementariedad de una región variable de la Ig dada. También se contemplan dentro de la invención los dominios de enlace que corresponden a menos de todas las CDR de una región variable de la Ig dada, siempre que tales dominios de enlace retengan la capacidad de enlazarse específicamente a una diana, como mínimo.

La proteína de enlace multivalente con función efectora también tiene una secuencia de la subregión constante derivada de una región constante de inmunoglobulina, preferentemente una región constante de la cadena pesada del anticuerpo, covalentemente yuxtapuesta entre los dos dominios de enlace en la proteína de enlace multivalente con función efectora.

La proteína de enlace multivalente con función efectora también tiene a un ligador de escorpión que une el extremo C terminal de la subregión constante al extremo N terminal del dominio de enlace 2. El ligador de escorpión no es un péptido helicoidal y puede derivarse de una región de bisagra del anticuerpo, de una región que conecta los dominios de enlace de una inmunoglobulina o de la región de tallo de las C-lectinas de tipo II. El ligador de escorpión puede derivarse de una región de bisagra de tipo silvestre de una inmunoglobulina, tal como una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD o una región de bisagra de IgE. En otras formas de realización, la invención proporciona proteínas de enlace multivalentes con bisagras alteradas. Una categoría de regiones de bisagra alteradas apropiadas para la inclusión en las proteínas de enlace multivalentes es la categoría de bisagras con un número alterado de residuos cisteína, en particular aquellos residuos Cys conocidos en el arte por participar en la formación

de enlaces disulfuro intercatenarios en las moléculas de contrapartes de inmunoglobulina que tienen bisagras de tipo silvestre. Por lo tanto, las proteínas pueden tener una bisagra IgG1 donde falta uno de los tres residuos Cys capaces de participar en las formaciones de enlaces disulfuro intercatenarios. Para indicar la subestructura de cisteína de las bisagras alteradas, la subsecuencia de Cys se presenta desde el extremo N terminal al extremo C terminal. Usando este sistema de identificación, las proteínas de enlace multivalentes con bisagras alteradas de la IgG incluyen estructuras de bisagra caracterizadas como cxc, xxc, ccx, xxc, xcx, cxx y xxx. Los residuos Cys pueden ser suprimidos o sustituidos por un aminoácido que dé lugar a una sustitución conservadora o una sustitución no-conservadora. En algunas formas de realización, la cisteína se reemplaza por una serina. Para las proteínas con ligadores de escorpión que comprenden las bisagras de la IgG1, el número de cisteínas correspondiente a las cisteínas de bisagra se reduce a 1 ó 2, preferentemente con uno de esas cisteínas correspondientes a la cisteína de bisagra dispuesta más cerca del extremo N terminal de la bisagra.

Para las proteínas con ligadores de escorpión que comprenden las bisagras de la IgG2, puede haber 0, 1, 2, 3 o 4 residuos Cys. Para los ligadores de escorpión que comprenden bisagras IgG2 alteradas que contienen 1, 2 ó 3 residuos Cys, se contemplan todos los subconjuntos posibles de residuos de Cys. Por lo tanto, para tales ligadores que tienen una Cys, las proteínas de enlace multivalentes pueden tener el siguiente motivo de Cys en la región de bisagra: cxxx, xcxx, xxcx o xxxc. Para los ligadores de escorpión que comprenden variantes de la bisagra IgG2 que tienen 2 ó 3 residuos Cys, se contemplan todas las combinaciones posibles de residuos Cys retenidos y sustituidos (o suprimidos). Para las proteínas de enlace multivalentes con ligadores de escorpión que comprenden regiones de bisagra IgG3 alteradas o de IgG4 alteradas, se contempla una reducción en los residuos Cys de 1 a uno menos que el número completo de residuos Cys en la región de la bisagra, independientemente de si

la pérdida es mediante la supresión o la sustitución por los aminoácidos conservadores o no-conservadores (por ejemplo, serina). De manera similar, se contemplan las proteínas de enlace multivalentes que tienen un ligador de escorpión que comprende una bisagra IgA, IgD o IgE de tipo silvestre, como así también las correspondientes regiones de bisagra alteradas que tienen un número reducido de residuos de Cys que se extienden de 0 a uno menos que el número total de residuos de Cys encontrados en la bisagra correspondiente de tipo silvestre. En algunas formas de realización que tienen una bisagra de IgG1, se retiene el primer residuo Cys, o del extremo N terminal, de la bisagra. Para las proteínas con regiones de bisagra de tipo silvestre o alteradas, se contempla que las proteínas de enlace multivalentes sean las moléculas monocatenarias capaces de formar homo-multímeros, como dímeros, por ejemplo, mediante la formación de enlaces disulfuro. Aún más, las proteínas con bisagras alteradas pueden tener alteraciones en los extremos terminales de la región de bisagra, por ejemplo, la pérdida o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en el extremo N terminal, C terminal o ambos extremos, de una región o dominio dado, como un dominio de bisagra, según se revela aquí.

En otra forma de realización de ejemplo, la subregión constante se deriva de una región constante que comprende una región de bisagra de IgD natural o diseñada con técnicas de ingeniería genética. La bisagra de IgD humana de tipo silvestre tiene una cisteína que forma un enlace de disulfuro con la cadena ligera en la estructura de la IgD natural. En algunas formas de realización, se muta esta cisteína de bisagra de la IgD (por ejemplo, se suprime) para generar una bisagra alterada que se usa como una región de conexión entre los dominios de enlace de, por ejemplo, una molécula biespecífica. Otros cambios, eliminaciones o alteraciones de aminoácidos en una bisagra IgD que no dan lugar a la falta de flexibilidad de la bisagra no deseada, están dentro del alcance de la invención. Las regiones de bisagra de IgD natural o generada con técnicas de ingeniería genética de otras especies también se encuentran dentro del

alcance de la invención, como lo están las bisagras de IgD humanizada natural o generada con técnicas de ingeniería genética, de especie no-humana y regiones de bisagra (no-IgD) de otros isotipos de anticuerpos humanos o no-humanos (como la bisagra de IgG2 de llama).

La invención también comprende las subregiones constantes adheridas a los ligadores de escorpión que pueden derivarse de las bisagras que corresponden a una región de bisagra conocida, como una bisagra de la IgG1 o una bisagra de la IgD, como se observó anteriormente. La subregión constante puede contener una región de bisagra modificada o alterada (respecto del tipo silvestre), en la cual al menos un residuo cisteína conocido por participar en la ligadura del enlace disulfuro intercatenario es reemplazado por otro aminoácido en una sustitución conservadora (por ejemplo, Ser por Cys) o una sustitución no conservadora. La subregión constante no incluye una región de péptido o dominio que corresponde a un dominio C_{H1} de inmunoglobulina.

Las secuencias alternativas de bisagra y ligadoras que pueden usarse como regiones de conexión provienen de las porciones de los receptores de la superficie celular que conectan los dominios similares a V de inmunoglobulina o los dominios similares a C de inmunoglobulina. Las regiones entre los dominios similares a V de Ig, donde el receptor de la superficie celular contiene múltiples dominios similares a V de Ig en tándem; y entre los dominios similares a C de Ig, donde el receptor de la superficie celular contiene múltiples regiones similares a C de Ig, también se contemplan como regiones de conexión. Las secuencias de bisagra y ligadoras tienen, típicamente, una longitud 5 a 60 aminoácidos, y pueden ser primariamente flexibles, pero también pueden proporcionar características más rígidas. Además, los ligadores con frecuencia disponen espaciamiento que facilita la reducción al mínimo del impedimento estérico entre los dominios de enlace. Con preferencia, estos péptidos de bisagra y ligadores son principalmente de estructura α helicoidal, con una mínima estructura tipo hoja β. Las secuencias preferidas son estables en plasma y suero, y son resistentes al clivado

proteolítico. Las secuencias preferidas pueden contener un motivo natural o agregado como el motivo de CPPC que confiere un enlace de disulfuro para estabilizar la formación de dímeros. Las secuencias preferidas pueden contener uno o más sitios de glicosilación. Los ejemplos de secuencias de bisagra y ligadoras preferidas incluyen, pero no se limitan a, las regiones interdominio entre las regiones similares a V de Ig y regiones similares a C de Ig de CD2, CD4, CD22, CD33, CD48, CD58, CD66, CD80, CD86, CD150, CD166 y CD244.

La subregión constante puede derivarse de una región constante camélida, como IgG2 o IgG3 de llama o camello.

Específicamente se contempla una subregión constante que tiene la región C_{H2}-C_{H3} de cualquier clase de Ig, o de cualquier subclase de IgG, como IgG1 (por ejemplo, IgG1 humana). En las formas de realización preferidas, tanto la subregión constante como el ligador de escorpión derivado de una bisagra de inmunoglobulina derivan de la misma clase de Ig. En otras formas de realización preferidas, tanto la subregión constante como el ligador de escorpión derivado de una bisagra de inmunoglobulina derivan de la misma subclase de Ig. La subregión constante también puede ser un dominio CH3 de cualquier clase o subclase de Ig, como IgG1 (por ejemplo, IgG1 humana), siempre que se asocie con al menos una función efectora de inmunoglobulina.

La subregión constante no corresponde a una región constante de inmunoglobulina completa (es decir, C_{H1}- bisagra-C_{H2}- C_{H3}) de la clase IgG. La subregión constante puede corresponder a una región constante de inmunoglobulina completa de otras clases. Los dominios constantes de IgA, como los dominios de bisagra IgA1, bisagra IgA2, IgA C_{H2} e IgA C_{H3} con un inserto mutado o faltante, también se contemplan como subregiones constantes. Aún más, cualquier dominio constante de la cadena ligera puede funcionar como una subregión constante, por ejemplo, C_K o cualquier C_L. La subregión constante también puede incluir JH o JK, con o sin una

bisagra. La subregión constante también puede corresponder a los anticuerpos diseñados con técnicas de ingeniería genética en los cuales, por ejemplo, se ha construido un injerto de bucle al hacer las sustituciones de aminoácidos seleccionadas usando un entramado de IgG para generar un sitio de enlace para un receptor diferente de un F_CR natural (CD16, CD32, CD64, $F_C\varepsilon R1$), según se comprende en el arte. Una subregión constante ejemplar de este tipo es una región C_{H2}- C_{H3} de IgG modificada para tener un sitio de enlace CD89.

Este aspecto de la invención proporciona una proteína o péptido de enlace multivalente que tiene función efectora, que comprende, que consta esencialmente de, o que consta de: (a) una secuencia de polipéptidos del dominio de enlace que se dispone en el extremo N terminal, derivada de una inmunoglobulina que se fusiona o de otro modo se conecta a (b) una secuencia de polipéptidos de la subregión constante derivada de una región constante de inmunoglobulina, que preferentemente incluye una secuencia de regiones de bisagra, donde el polipéptido de la región de bisagra puede ser según se describe aquí y puede comprender, constar esencialmente de, o constar de, por ejemplo, una secuencia de polipéptidos de la región de bisagra alternativa, a su vez fusionada o de otro modo conectada a (c) una segunda secuencia de polipéptidos del dominio de enlace, natural o generada por técnicas de ingeniería genética que se dispone en el extremo C terminal, derivada de una inmunoglobulina.

La secuencia de polipéptidos de la subregión constante dispuesta en forma central derivada de una región constante de inmunoglobulina tiene, al menos, una actividad inmunológica seleccionada del grupo que consta de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos, CDC, fijación de complementos y enlace con el receptor F_C; y los polipéptidos del dominio de enlace son, en todos los casos, capaces de enlazarse o enlazarse específicamente a una diana, tal como un antígeno, donde las dianas pueden ser iguales o diferentes, y pueden encontrarse eficazmente en el mismo entorno fisiológico (por ejemplo, la superficie de la misma célula) o en diferentes

entornos (por ejemplo, diferentes superficies celulares, una superficie celular y una ubicación acelular, como en solución).

Este aspecto de la invención también comprende variantes de proteínas o polipéptidos que exhiben una función efectora que es, al menos, 80% y preferentemente 85%, 90%, 95% ó 99% idéntica a una proteína multivalente con función efectora de secuencia específica como se revela aquí.

Polinucleótidos

La invención también proporciona polinucleótidos (polinucleótidos aislados, purificados o puros), que codifican las proteínas o los péptidos según la invención, vectores (incluidos vectores de clonación y vectores de expresión) que comprenden tales polinucleótidos y células (por ejemplo, células hospedantes) transformados o transfectados con un polinucleótido o vector según la invención. En la codificación de las proteínas o polipéptidos de la invención, los polinucleótidos codifican un primer dominio de enlace, un segundo dominio de enlace y un dominio F_C, siempre derivados de las inmunoglobulinas, preferentemente de las inmunoglobulinas humanas. Cada dominio de enlace puede contener una secuencia correspondiente a una secuencia de la región variable de longitud completa (cadena pesada y/o cadena ligera), o a una secuencia parcial de ésta, siempre que cada uno de tales dominios de enlace retenga la capacidad de enlazarse específicamente. El dominio F_C puede tener una secuencia que corresponda a una secuencia del dominio F_C de inmunoglobulina de longitud completa o a una secuencia parcial de éste, siempre que el dominio F_C exhiba al menos una función efectora, tal como se define aquí. Además, cada uno de los dominios de enlace puede unirse al dominio F_C por medio de un péptido ligador que, típicamente, tiene una longitud de 8 aminoácidos, como mínimo; y preferentemente de 13 aminoácidos, como mínimo. Una secuencia ligadora preferida es una secuencia basada en el motivo Gly_4Ser , tal como $(Gly_4Ser)_3$.

Las variantes de la proteína de enlace multivalente con función efectora también quedan comprendidas dentro del alcance de la invención. Las variantes de polinucleótidos son al menos 90%, y preferentemente 95%, 99% ó 99,9% idénticas a uno de los polinucleótidos de secuencia definida según se describe aquí, o que se hibridan a uno de esos polinucleótidos de secuencia definida bajo condiciones de hibridación rigurosas de 0,015 M de cloruro de sodio; 0,0015 M de citrato de sodio a 65-68°C ó 0,015 M de cloruro de sodio; 0.0015 M de citrato de sodio y 50% de formamida a 42°C. Las variantes polinucleótidas retienen la capacidad de codificar una proteína de enlace multivalente con función efectora.

Los términos "riguroso/rigurosa/rigurosos/rigurosas" se usan para hacer referencia a las condiciones que se comprenden comúnmente en el arte como rigurosas. La rigurosidad de la hibridación se determina, fundamentalmente, por la temperatura, fuerza iónica y la concentración de agentes desnaturalizantes, tales como la formamida. Los ejemplos de "condiciones rigurosas" para la hibridación y el lavado son 0,015 M de cloruro de sodio; 0,0015 M de citrato de sodio a 65-68°C ó 0,015 M de cloruro de sodio; 0,0015M de citrato de sodio y 50% de formamida a 42°C. Ver Sambrook y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1989).

También pueden usarse condiciones más rigurosas (como mayor temperatura, menor fuerza iónica, formamida superior, u otro agente desnaturalizante); sin embargo, se verá afectada la velocidad de hibridación. En los casos referidos a la hibridación de desoxioligonucleótidos, los ejemplos de condiciones adicionales de hibridación rigurosas incluyen el lavado en 6x SSC, 0,05% de pirofosfato de sodio a 37°C (para los oligonucleótidos de 14 bases), a 48°C (para los oligonucleótidos de 17 bases), a 55°C (para los oligonucleótidos de 20 bases) y a 60°C (para oligonucleótidos de 23 bases).

En un aspecto relacionado de la invención, se proporciona un método para producir un polipéptido, proteína u otra construcción de la invención, por ejemplo, que

incluya una proteína o péptido de enlace multivalente que tiene función efectora, que comprende los pasos de: (a) cultivar una célula hospedante según se describe o se proporciona aquí en condiciones que permiten la expresión de la construcción; y (b) aislar el producto de expresión, por ejemplo, la proteína o el péptido de enlace multivalente con función efectora de la célula hospedante o el cultivo de células hospedantes.

Construcciones

La presente invención también se relaciona con los vectores, y las construcciones preparadas a partir de vectores conocidos, donde cada uno incluye un polinucleótido o ácido nucleico de la invención y, en particular, se relaciona con construcciones de expresión recombinante, incluidas cualquiera de diversas construcciones conocidas, incluso las construcciones de administración, útiles para la terapia génica, que incluyen cualquier ácido nucleico que codifique proteínas y polipéptidos de enlace multivalentes, por ejemplo, multiespecíficos, incluso biespecíficos, con función efectora, según lo que se indica en la presente; se relaciona con las células hospedantes que se diseñan genéticamente con vectores y/u otras construcciones de la invención y se relaciona con los métodos para administrar las construcciones de expresión, u otras, que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas de enlace multivalentes, por ejemplo, multiespecíficas, incluso biespecíficas, con función efectora, o bien sus fragmentos o variantes, mediante técnicas recombinantes.

Diversas construcciones de la invención, incluso las proteínas de enlace multivalentes, por ejemplo, multiespecíficas, con función efectora, pueden expresarse en prácticamente cualquier célula hospedante, incluso células hospedantes *in vivo* en el caso de uso para la terapia génica, bajo el control de los promotores apropiados, según la naturaleza de la construcción (por ejemplo, tipo de promotor, como se describió anteriormente) y la naturaleza de la célula hospedante conveniente (por ejemplo,

posmitótica diferenciada en el extremo terminal o activamente divisora, por ejemplo el mantenimiento de una construcción expresable como un episoma o integrada en el genoma de la célula hospedante).

La clonación y los vectores de expresión aptos para su empleo con hospedantes procarióticos y eucarióticos se describen, por ejemplo, en Sambrook, y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor, NY, (1989). Los ejemplos de vectores de clonación / expresión incluyen, sin limitación, vectores de clonación, vectores lanzadera y construcciones de expresión, que pueden basarse en plásmidos, fagémidos, fásmidos, cósmidos, virus, cromosomas artificiales, o cualquier vehículo de ácido nucleico apropiado para la amplificación, la transferencia, y/o la expresión de un polinucleótido contenido allí que se conoce en el arte. Según se observa aquí, en las formas de realización preferidas de la invención, la expresión recombinante se realiza en las células mamíferas que se han transfectado, transformado o transducido con un ácido nucleico según la invención. Ver, también, por ejemplo: Machida, C. A., *"Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols"*; Wolff, J. A, *"Gene Therapeutics: Methods and Applications of Direct Gene Transfer"* (Birkhauser 1994); Stein, U. y Walther, W. (eds., "*Gene Therapy of Cancer: Methods and Protocols"* (Humana Press 2000); Robbins, P. D. (ed.), *"Gene Therapy Protocols"* (Humana Press 1997); Morgan, J. R. (ed.), *"Gene Therapy Protocols"* (Humana Press 2002); Meager, A. (ed.), *"Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations: From Laboratory to Clinic"* (John Wiley & Sons Inc. 1999); MacHida, C. A. y Constant, J. G., *"Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols"* (Humana Press 2002); *"New Methods Of Gene Therapy For Genetic Metabolic Diseases NIH Guide,"* volumen 22, número 35, 1 de octubre de 1993. Ver, también, las patentes estadounidenses números 6.384.210; 6.384.203; 6.384.202; 6.384.018; 6.383.814; 6.383.811; 6.383.795; 6.383.794; 6.383.785; 6.383.753; 6.383.746; 6.383.743; 6.383.738; 6.383.737;

6.383.733; 6.383.522; 6.383.512; 6.383.481; 6.383.478; 6.383.138; 6.380.382; 6.380.371; 6.380.369; 6.380.362; 6.380.170; 6.380.169; 6.379.967 y 6.379.966.

De manera característica, las construcciones de expresión se derivan de los vectores plásmidos. Una construcción preferida es un vector pNASS modificado (Clontech, Palo Alto, CA), que tiene secuencias de ácidos nucleicos que codifican un gen de resistencia a la ampicilina, una señal poliadenilación y un sitio del promotor T7. Son, igualmente, bien conocidos otros vectores de expresión de mamífero (ver, por ejemplo, Ausubel y colaboradores, 1995; Sambrook y colaboradores, *ya citado*; ver también, por ejemplo, los catálogos de Invitrogen, San Diego, CA; Novagen, Madison, WI; Pharmacia, Piscataway, NJ). Actualmente se prefieren las construcciones preparadas de manera de incluir una secuencia codificadora de la dihidrofolato reductasa (DHFR) bajo control reglamentario apropiado, para promover los niveles de producción mejorados de la proteína de enlace multivalente con función efectora, cuyos niveles son el resultado de la amplificación génica posterior a la aplicación de un agente apropiado de selección (*por ejemplo,* el metotrexato).

En general, los vectores de expresión recombinante incluyen orígenes de replicación y los marcadores seleccionables que permiten la transformación de la célula hospedante, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural aguas abajo, como se describió anteriormente. Un vector en enlace operable con un polinucleótido según la invención produce una construcción de clonación o expresión. Las construcciones de clonación / expresión ejemplares contienen al menos un elemento de control de expresión, por ejemplo, un promotor operablemente vinculado a un polinucleótido de la invención. Los elementos de control expresión adicionales, como los mejoradores, los sitios de enlace específicos de factores, los terminadores y los sitios de enlace a ribosoma también se contemplan en los vectores y las construcciones de clonación/expresión según la invención. La secuencia estructural heteróloga del polinucleótido según la invención se

ensambla en la fase apropiada con secuencias de traducción, iniciación y terminación. Por lo tanto, por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de enlace multivalentes, tal como se explica aquí, pueden incluirse en cualquiera de una variedad de construcciones del vector de expresión, como una construcción de expresión recombinante para expresar tal proteína en una célula hospedante. En ciertas formas de realización preferidas las construcciones están incluidas en las formulaciones que se administran *in vivo*. Tales vectores y construcciones incluyen secuencias de ADN cromosómico, no-cromosómico y sintético, por ejemplo, los derivados de SV40; los plásmidos bacterianos; el ADN del fago; los plásmidos de levadura; los vectores derivados de las combinaciones de los plásmidos y el ADN del fago, el ADN vírico, tal como vaccinia, el adenovirus, el virus de viruela de las aves y la seudorrabia, o los retrovirus deficientes de replicación según se describe más adelante. Sin embargo, puede usarse otro vector para preparar una construcción de expresión recombinante, y en las formas de realización preferidas tal vector será replicable y viable en el hospedante.

Las secuencias apropiadas de ADN pueden insertarse en un vector, por ejemplo, a través de una variedad de procedimientos. En general, una secuencia de ADN se inserta en uno o más sitios de clivado por endonucleasa de restricción apropiados, con los procedimientos conocidos en el arte. Se contemplan las técnicas ordinarias para la clonación, el aislamiento, la amplificación y la purificación de ADN, para las reacciones enzimáticas que incluyen la ligasa de ADN, la polimerasa de ADN, las endonucleasas de restricción y demás, y diversas técnicas de separación. Se describe una cantidad de técnicas estándar, por ejemplo, en Ausubel y colaboradores, (1993 *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, M. A.); Sambrook y colaboradores, (1989 *Molecular Cloning*, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Maniatis y colaboradores, (1982 *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Glover (Ed.) (1985 *DNA Cloning,* Vol. I and II,

IRL Press, Oxford, UK); Hames and Higgins (Eds.), (1985 *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, UK); y en otra bibliografía.

La secuencia de ADN en el vector de expresión está operativamente vinculada a, al menos, una expresión apropiada de la secuencia de control (por ejemplo, un promotor constitutivo o un promotor regulado) para dirigir la síntesis de ARNm. Los ejemplos representativos de tales secuencias de control de expresión incluyen promotores de las células eucariotas o sus virus, como se describió anteriormente. Las regiones del promotor pueden seleccionarse de cualquier gen conveniente utilizando vectores CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Los promotores eucarióticos incluyen el promotor inmediato temprano del CMV, timidina quinasa de HSV, promotor temprano y tardío de SV40, LTR de un retrovirus y metalotioneína-I de ratones. La selección del vector y el promotor apropiados se encuentra dentro del nivel de la habilidad ordinaria en el arte, y la preparación de ciertas construcciones de expresión recombinante particularmente preferidas comprende, al menos, un promotor o promotor regulado operablemente vinculado a un ácido nucleico que codifica una proteína o polipéptido según la invención que se describe aquí.

La transcripción del ADN que codifica las proteínas y los polipéptidos de la invención por eucariotas superiores puede aumentarse al insertar una secuencia mejoradora en el vector. Los ejemplos incluyen el mejorador SV40 en el lado tardío del origen de replicación bp 100 a 270, un mejorador del promotor temprano del citomegalovirus, el mejorador polioma en el lado tardío del origen de replicación y los mejoradores de adenovirus.

También se contemplan las terapias génicas empleando los ácidos nucleicos de la invención, que comprenden las estrategias para reemplazar los genes defectuosos o agregar genes nuevos a las células y/o los tejidos y está desarrollándose para la aplicación en el tratamiento del cáncer, la corrección de los trastornos metabólicos y en

el campo de la inmunoterapia. Las terapias génicas de la invención incluyen el uso de diversas construcciones de la invención, con o sin otro portador o vehículo de administración o construcciones independientes, para el tratamiento de las enfermedades, los trastornos, y/o las afecciones indicadas en la presente. Tales construcciones también pueden usarse como vacunas para el tratamiento o la prevención de las enfermedades, los trastornos y/o las afecciones indicadas en la presente. Las vacunas de ADN, por ejemplo, usan los polinucleótidos que codifican la proteína inmunógena y los determinantes de ácidos nucleicos para estimular el sistema inmunitario contra los agentes patógenos o las células tumorales. Tales estrategias pueden estimular la inmunidad adquirida o innata o pueden implicar la modificación de la función inmunitaria mediante la expresión de citocina. La terapia génica *in vivo* incluye la inyección directa del material genético en un paciente o animal, típicamente para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o los síntomas asociados con una enfermedad. Las vacunas y la modulación inmune son terapias sistémicas. Con terapias *in vivo* específicas de tejidos, como aquellas que se orientan al tratamiento del cáncer, se prefieren los sistemas de administración de genes y/o de expresión/orientados. Los vectores de terapia génica diversos que tienen como diana tejidos específicos se conocen en el arte, y se han desarrollado procedimientos físicamente orientados a tejidos específicos, por ejemplo, usando las tecnologías basadas en catéter, todo lo cual se encuadra en la presente.

Los enfoques *ex vivo* de terapia génica también se contemplan aquí e incluyen la remoción, la modificación genética, la ampliación y readministración de las células propias del sujeto, por ejemplo, el paciente humano. Los ejemplos incluyen trasplante de médula ósea para el tratamiento del cáncer o la modificación genética de las células de progenitoras linfoides. La terapia génica *ex vivo* se aplica preferentemente al tratamiento de las células que son fácilmente accesibles y pueden sobrevivir en el

cultivo durante el proceso de transferencia de genes (como la sangre o las células de la piel).

Los vectores útiles de terapia génica incluyen vectores adenovíricos, vectores lentivirales, vectores del virus Adeno-asociado (AAV), vectores del virus de herpes simple (HSV), y vectores retrovíricos.

Las terapias génicas también pueden llevarse a cabo usando el "ADN desnudo", la administración basada en liposoma, la administración basada en lípidos (incluido el ADN unido a los lípidos con carga positiva), la electroporación y la proyección balística. En ciertas formas de realización, incluyendo sin carácter limitativo las formas de realización de terapias génicas, el vector puede ser un vector vírico como, por ejemplo, un vector retrovírico. Miller y colaboradores, 1989 *BioTechniques* 7:980; Coffin y Varmus, 1996 *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Por ejemplo, los retrovirus de los cuales los vectores de plásmido retrovírico pueden derivarse incluyen, sin limitación: el virus de leucemia murina de Moloney, el virus de necrosis esplénica, los retrovirus como tales como el virus del sarcoma de Rous, el virus del sarcoma de Harvey, el virus de leucosis aviar, el virus de la leucemia de simios gibbon, el virus de la inmunodeficiencia humana, el adenovirus, el virus del sarcoma mieloproliferativo y el virus tumoral mamario.

Los retrovirus son los virus de ARN que pueden reproducirse e integrarse en el genoma de una célula hospedante vía un ADN intermedio. Este ADN intermedio, o provirus, puede integrarse de manera estable en el ADN de la célula hospedante. Según ciertas formas de realización de la presente invención, una construcción de expresión puede comprender un retrovirus en el cual un gen extraño que codifica una proteína extraña se incorpora en lugar del ARN retrovírico normal Cuando el ARN retrovírico se introduce en una célula hospedante coincidente con infección, el gen extraño también se introduce en la célula y luego puede integrarse en el ADN de la

célula hospedante como si fuera parte del genoma retrovírico. La expresión de este gen extraño dentro del hospedante da lugar a la expresión de la proteína extraña.

La mayoría de los sistemas de vectores retrovíricos que se han desarrollado para la terapia génica se basan en los retrovirus murinos. Tales retrovirus existen en dos formas, como partículas víricas libres denominadas viriones, o como provirus integrados en el ADN de la célula hospedante. La forma de virión del virus contiene las proteínas estructurales y enzimáticas del retrovirus (incluida la enzima transcriptasa inversa), dos copias de ARN del genoma vírico y porciones de la membrana plasmática de células fuente que contienen glucoproteína del envoltorio vírico. El genoma retrovírico se organiza en cuatro regiones principales: la repetición terminal larga (LTR, *por su sigla en inglés*), que contiene elementos de actuación *cis* necesarios para la iniciación y la terminación de la transcripción y está situado en las posiciones 5' y 3' de los genes codificantes y los tres genes que codifican *gag*, *pol* y *env*. Estos tres genes, gag, *pol* y *env* codifican, respectivamente, las estructuras víricas internas, las proteínas enzimáticas (como integrasa) y la glicoproteína del envoltorio (denominadas gp70 y p15e) que confiere la infectividad y la especificidad del rango hospedante del virus, así como el péptido "R" de la función indeterminada.

Las líneas celulares de envoltorio separadas y las líneas celulares que producen vectores se han desarrollado debido a los problemas de seguridad con respecto a los usos de los retrovirus, incluidos los usos en las construcciones de expresión. Brevemente, esta metodología emplea el uso de dos componentes, un vector retrovírico y una línea celular de empaquetamiento (PCL, *por su sigla en inglés*). El vector retrovírico contiene repeticiones terminales largas (LTR, *por su sigla en inglés*), el ADN extraño a ser transferido y una secuencia de empaquetamiento (y). Este vector retrovírico no se reproducirá por sí mismo porque los genes que codifican las proteínas estructurales y de empaquetamiento no están incluidos dentro del genoma de vectores. La PCL contiene genes que codifican las proteínas gag, *pol* y *env*, pero no contiene la

señal de empaquetamiento "y". Por lo tanto, una PCL sólo puede formar partículas de viriones vacías por sí misma. Dentro de este método general, el vector retrovírico se introduce en la PCL y, de ese modo, crea una línea celular que produce vectores (VCL, *por su sigla en inglés*). Esta VCL elabora las partículas de viriones que contienen sólo el genoma extraño del vector retrovírico, y por consiguiente ya fue considerada un vector seguro de retrovirus para uso terapéutico.

Una "construcción de vectores retrovíricos" se refiere a un ensamble que es, dentro de las formas de realización preferidas de la invención, capaz de dirigir la expresión de una o más secuencias o genes de interés, como las proteínas de enlace multivalente que codifican secuencias de ácidos nucleicos. Brevemente, la construcción de vectores retrovíricos debe incluir una LTR en 5', un sitio de enlace de ARNt, una señal de empaquetamiento, un origen de la síntesis de una segunda hebra de ADN y una LTR en 3'. Una variedad amplia de secuencias heterólogas puede estar incluida dentro de la construcción de vectores que incluye, por ejemplo, las secuencias que codifican una proteína (*por ejemplo,* la proteína citotóxica, el antígeno asociado con la enfermedad, la molécula accesoria inmune o el gen de reemplazo), o que son útiles como una molécula en sí misma (*por ejemplo,* como una ribozima o secuencia antisentido).

Las construcciones de vectores retrovíricos de la presente invención pueden construirse fácil y rápidamente a partir de una variedad amplia de retrovirus, incluidos por ejemplo, los retrovirus del tipo B, C y D, al igual que los espumavirus y lentivirus (ver, por ejemplo, *RNA Tumor Viruses*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985). Tales retrovirus pueden obtenerse fácilmente a partir de los depósitos o las colecciones como las de la *American Type Culture Collection* ("ATCC"; Rockville, Maryland), o pueden aislarse a partir de orígenes utilizando técnicas comúnmente disponibles. Cualquiera de los retrovirus anteriores puede utilizarse fácilmente para armar o construir las construcciones de vectores retrovíricos, células de

empaquetamiento o las células productoras de la invención, dada la revelación proporcionada aquí y las técnicas recombinantes ordinarias (por ejemplo, Sambrook y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Kunkle, 1985 *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:*488).

Los promotores apropiados que se usan en los vectores víricos en general pueden incluir, pero no se limitan a: la LTR retrovírica; el promotor SV40; y el promotor del citomegalovirus humano (CMV), que se describen en Miller, y colaboradores, 1989 *Biotechniques* 7:980-990, u otro promotor (por ejemplo, promotores celulares como los promotores celulares eucarióticos que incluyen, pero no se limitan a, promotores histona, pol III y β-actina). Entre otros promotores víricos que pueden ser empleados se incluyen, sin limitación, los promotores de adenovirus, promotores de timidina quinasa (TK) y promotores de parvovirus B19. La selección de un promotor apropiado será evidente para los expertos en el arte de las enseñanzas contenidas aquí y puede ser entre cualquiera de los promotores regulados o los promotores que se describieron.

El vector de plásmido retrovírico se emplea para transducir líneas celulares de empaquetamiento para formar líneas celulares productoras. Los ejemplos de células de empaquetamiento que se pueden transfectar incluyen, sin limitación: las líneas celulares PE501, PA317, ψ-2, ψ-AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, ψCRE, ψCRIP, GP+E-86, GP+envAm12 y DAN, que se describen en Miller, *Human Gene Therapy*, *1*:5-14 (1990). El vector puede transducir las células de empaquetamiento a través de cualquier medio conocido en el arte. Tal medio incluye, pero no se limita a, la electroporación, el uso de los liposomas y la precipitación de $CaPO_4$. En una alternativa, el vector plásmido retrovírico puede encapsularse en un liposoma, o acoplarse a un lípido, y luego administrarse a un hospedante.

La línea celular productora genera partículas de vectores retrovíricos infecciosas que incluyen la secuencia de ácidos nucleicos que codifica las proteínas de enlace multivalentes con función efectora. Tales partículas de vectores retrovíricos luego

pueden ser empleadas para transducir células eucariotas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Las células eucariotas transducidas expresarán la secuencia de ácidos nucleicos que codifican la proteína o el polipéptido. Las células eucariotas que pueden transducirse incluyen, sin limitación: las células embrionarias primarias, así como las células madre hematopoyéticas, los hepatocitos, los fibroblastos, las células circulantes mononucleares y polimorfonucleares de sangre periféricas incluidas las células mielomonocíticas, los linfocitos, los mioblastos, los macrófagos tisulares, las células dendríticas, las células de Kupffer, las células linfoides y reticuloendoteliales de los ganglios linfáticos y el bazo, los queratinocitos, las células endoteliales y las células epiteliales bronquiales.

Células hospedantes

Un aspecto adicional de la invención proporciona una célula hospedante transformada o transfectada con -o que alguna otra manera contenga- cualquiera de los polinucleótidos o las construcciones de clonación / expresión de la invención. Los polinucleótidos y las construcciones de clonación / expresión se introducen en las células apropiadas usando cualquier método conocido en el arte, incluida la transformación, la transfección y transducción. Las células hospedantes incluyen las células de un sujeto sometido a terapia celular *ex vivo*, que incluye, por ejemplo, la terapia génica *ex vivo*. Las células hospedantes eucariotas contempladas como un aspecto de la invención, cuando albergan un polinucleótido, vector o proteína según la invención incluyen, además de las células propias de un sujeto (por ejemplo, las células propias de un paciente humano), las células VERO, las células HeLa, las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) (incluidas las células CHO modificadas capaces de modificar el patrón de glicosilación de las moléculas de enlace multivalentes expresadas (ver la solicitud patente de los EE. UU. publicada número 2003/0115614 A1, que se incorpora a modo de referencia), las células COS (tal como COS-7), W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562, células HEK293, células HepG2,

107

células N, células 3T3, células *Spodoptera frugiperda* (por ejemplo, células Sf9), células *Saccharomyces cerevisiae*, y cualquier otra célula eucariota conocida en el arte por ser útil para expresar y, optativamente, aislar una proteína o un péptido según la invención. También se contemplan las células procariotas, incluyendo sin carácter limitativo, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, un estreptomiceto, o cualquier célula procariota conocida en el arte que sea apropiada para expresar y, optativamente, aislar una proteína o un péptido según la invención. Al aislar la proteína o el péptido de las células procariotas, en particular, se contempla que pueden usarse las técnicas conocidas en el arte para extraer la proteína de los cuerpos de inclusión. La selección de un hospedante apropiado está dentro del alcance de los expertos en el arte de las enseñanzas que se incluyen en la presente.

Las células hospedantes diseñadas con técnicas de ingeniería genética pueden cultivarse en un medio nutricional convencional modificado según convenga para activar los promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes particulares. Las condiciones de cultivo para las células hospedantes particulares seleccionadas para la expresión, como la temperatura, el pH y demás, podrán ser fácilmente apreciadas por el experto en el arte. Diversos sistemas de cultivo de células mamíferas también pueden ser empleados para expresar la proteína recombinante. Los ejemplos de sistemas de expresión mamífera incluyen las líneas COS-7 de los fibroblastos renales de monos, descriptos por Gluzman, 1981*Cell,* 23:175, y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión mamífera comprenderán un origen de la replicación, un promotor apropiado y, optativamente, un mejorador y también cualquier sitio de enlace de ribosoma necesario, el sitio poliadenilación, sitios donadores y aceptantes de empalme, las secuencias de terminación de transcripción y las secuencias no transcriptas flanqueadoras en 5', por ejemplo según se describe aquí con respecto a la preparación de las construcciones de expresión de proteínas enlace multivalente. Las

secuencias de ADN derivadas del empalme SV40 y los sitios de poliadenilación pueden usarse para proporcionar los elementos genéticos no transcriptos necesarios. La introducción de la construcción en la célula hospedante puede ser efectuada por una variedad de métodos con los cuales los expertos en el arte estarán familiarizados, incluyendo sin carácter limitativo, la transfección de fosfato de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano o electroporación (Davis y colaboradores, 1986 *Basic Methods in Molecular Biology*).

En una forma de realización, la célula hospedante es transducida por una construcción vírica recombinante dirigida a la expresión de una proteína o polipéptido según la invención. La célula hospedante transducida produce partículas víricas que contienen proteína o polipéptido expresado derivado de las porciones de una membrana de célula hospedante incorporada por las partículas víricas durante brotamiento vírico.

Composiciones farmacéuticas

En algunas formas de realización, las composiciones de la invención, tal como una proteína de enlace multivalente o una composición que comprende un polinucleótido que codifica la proteína que se describe aquí, son adecuadas para su administración en las condiciones y durante el tiempo suficiente para permitir la expresión de la proteína codificada en una célula hospedante *in vivo* o *in vitro*, para la terapia génica, y similares. Tales composiciones pueden formularse en las composiciones farmacéuticas para la administración según las metodologías bien conocidas. Las composiciones farmacéuticas comprenden, en general, una o más construcciones de expresión recombinante, y/o los productos de expresión de tales construcciones, en combinación con un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. Dichos portadores son no tóxicos para los receptores cuando se administran en las dosificaciones y concentraciones empleadas. Para las formulaciones a base de ácidos nucleicos, o para las formulaciones que comprenden

los productos de expresión según la invención, se administrarán entre 0,01μg/kg y 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente, por ejemplo, por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa, o por cualquier vía conocida en el arte que resulte apropiada en un conjunto dado de circunstancias. Una dosificación preferida, por ejemplo, es de 1 μg/kg a 1 mg/kg, aproximadamente; donde particularmente se prefiere entre 5 μg/kg y 200 μg/kg, aproximadamente.

Será evidente para los expertos en el arte que la cantidad y la frecuencia de administración dependerán la respuesta del hospedante. Los portadores farmacéuticamente aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en el arte de las preparaciones farmacéuticas y se describen, por ejemplo, en *Remingtons Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985). Por ejemplo, pueden utilizarse solución salina estéril y solución salina amortiguada por fosfato a pH fisiológico. Los agentes conservantes, estabilizantes, colorantes y demás pueden incluirse en la composición farmacéutica. Por ejemplo, a modo de conservantes pueden agregarse benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres del ácido *p*-hidroxibenzoico. *Ídem a* 1449. Además, pueden utilizarse antioxidantes y agentes de suspensión. *Ídem.* Los compuestos de la presente invención pueden usarse en formas de base libre o de sal, y ambas se consideran dentro del alcance de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas que contienen a una o más construcciones de ácidos nucleicos de la invención, o las proteínas correspondientes a los productos codificados por tales construcciones de ácidos nucleicos, pueden presentarse en cualquier forma que permita administrar la composición a un paciente. Por ejemplo, la composición puede ser en forma de un sólido, líquido o gas (aerosol). Las vías características de administración incluyen, sin limitación, oral, tópica, parenteral (por ejemplo, sublingual o bucal), sublingual, rectal, vaginal e intranasal. El término parenteral, tal como se lo utiliza en la presente, incluye inyecciones subcutánea,

intravenosa, intramuscular, intraesternal, intracavernosa, intratecal, intrameatal, intrauretral o técnicas de infusión. La composición farmacéutica se formula para permitir que los principios activos contenidos allí sean biodisponibles cuando se administra la composición a un paciente. Las composiciones que le serán administradas a un paciente adoptan la forma de una o más formas farmacéuticas, donde por ejemplo, un comprimido puede ser una forma farmacéutica unitaria, y un envase de uno o más compuestos de la invención en la forma de aerosol pueden contener una pluralidad de formas farmacéuticas.

Para la administración oral, puede encontrarse presente un excipiente y/o aglutinante. Los ejemplos son sacarosa, caolina, glicerina, dextrinas de almidón, alginato de sodio, carboximetil celulosa y etil celulosa. Se pueden incluir agentes colorantes y/o saborizantes. Se puede emplear un recubrimiento.

La composición puede ser en forma de un líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser para la administración oral o inyectable, por ejemplo. Cuando se destinan a la administración oral, las composiciones preferidas contienen, además de una o más construcciones de fusión de inmunoglobulina-dominio de enlace o producto expresado, uno o más de un agente endulzante, agente conservante, colorante y mejorador del sabor. En una composición concebida para administrarse por inyección, pueden incluirse uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente de dispersión, agente de suspensión, solución amortiguadora, estabilizante y agente isotónico.

Una composición farmacéutica líquida como se usa aquí, ya sea en forma de una solución, suspensión u otra forma similar, puede incluir uno o más de los siguientes coadyuvantes: diluyentes estériles como el agua para inyección, solución salina, preferentemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como el solvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros

solventes; agentes antibacterianos como el alcohol bencílico o el metil parabeno; antioxidantes como el ácido ascórbico o el bisulfito de sodio; agentes quelantes como ácido etilendiaminatetraacético; amortiguadores como los acetatos, citratos o fosfatos y los agentes para el ajuste de la tonicidad como el cloruro de sodio o la dextrosa. La preparación parenteral puede colocarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples fabricados en vidrio o plástico. La solución salina fisiológica es un coadyuvante preferido. Una composición farmacéutica inyectable es preferentemente estéril.

Quizá también sea aconsejable incluir otros componentes en la preparación, como los vehículos de suministro que incluyen, sin limitación, las sales de aluminio, las emulsiones de agua-en-aceite, los vehículos de aceite biodegradable, las emulsiones de aceite-en-agua, las microcápsulas biodegradables y los liposomas. Los ejemplos de las sustancias inmunoestimulantes (coadyuvantes) para uso en tales vehículos incluyen N-acetilmuramil-L-alanina-D-isoglutamina (MDP), lipopolisacáridos (LPS), glucano, IL-12, GM-CSF, interferón gamma e IL-15.

Si bien se puede emplear cualquier portador apropiado conocido por los expertos en el arte en las composiciones farmacéuticas de esta invención, el tipo de portador variará según la modalidad de administración y si se desea una liberación sostenida. Para la administración parenteral, como la inyección subcutánea, el portador comprende preferentemente agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o una solución amortiguadora. Para la administración oral, puede utilizarse cualquiera de los portadores anteriores o bien un portador sólido, como el mannitol, la lactosa, el almidón, el estearato de magnesio, la sacarina de sodio, el talco, la celulosa, la glucosa, la sacarosa y el carbonato de magnesio. Las microesferas biodegradables (por ejemplo, galactida polilática) también pueden ser empleadas como portadores para las composiciones farmacéuticas de esta invención. Las microesferas biodegradables que resultan adecuados se revelan en las patentes estadounidenses números 4.897.268 y

5.075.109. En este sentido, es preferible que la microesfera sea de más de 25 micrones, aproximadamente.

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener diluyentes, tales como soluciones amortiguadoras; antioxidantes como el ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de 10 residuos, aproximadamente), proteínas, aminoácidos, carbohidratos (por ejemplo, glucosa, sacarosa o dextrinas); agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), glutatión y otros estabilizantes y excipientes. La solución salina amortiguada neutra o la solución salina que se mezcla con albúmina sérica no-específica son ejemplos de los diluyentes apropiados. Con preferencia, el producto se formula como un liofilizado en el que se utilizan las soluciones excipientes apropiadas (por ejemplo, la sacarosa) como diluyentes.

Las composiciones farmacéuticas según la invención también incluyen las proteínas estabilizadas y los preparados farmacéuticos líquidos estables en conformidad con la tecnología conocida en el arte, incluida la tecnología revelada en la solicitud de patente estadounidense publicada número 2006/0008415A1, que se incorpora a la presente por referencia. Tales tecnologías incluyen la obtención de derivados de una proteína, donde la proteína comprende un grupo de tiol acoplado a N-acetilo-L-cisteína, N-etilo-maleimida, o cisteína.

Como se describió, la invención incluye composiciones capaces de proporcionar las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de enlace multivalentes con función con efectora. Tales composiciones incluyen vectores víricos recombinantes, por ejemplo retrovirus (ver las patentes WO 90/07936, WO 91/02805, WO 93/25234, WO 93/25698 y WO 94/03622); adenovirus (ver Berkner, 1988 *Biotechniques* 6:616-627; Li y colaboradores, 1993 *Hum. Gene Ther.* 4:403-409; Vincent y colaboradores, *Nat. Genet.* 5:130-134; y Kolls y colaboradores, 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:215-219); virus de viruela (ver la patente estadounidense número 4.769.330; la patente estadounidense número 5.017.487 y la WO 89/01973)), moléculas de construcciones de ácidos

nucleicos de expresión recombinante que forman complejos con una molécula policatiónica (ver la WO 93/03709), y ácidos nucleicos asociados con liposomas (ver Wang y colaboradores, 1987 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851). En ciertas formas de realización, el ADN puede enlazarse a adenovirus destruidos o inactivados (ver Curiel y colaboradores, 1992 *Hum. Gene Ther.* 3:147-154; Cotton y colaboradores, 1992 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89*:6094). Otras composiciones adecuadas incluyen combinaciones ADN-ligando (ver Wu y colaboradores, 1989 *J. Biol. Chem. 264*:16985-16987) y de lípido-ADN (ver Felgner y colaboradores, 1989 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417).

Además de procedimientos directos *in vivo,* se pueden utilizar procedimientos *ex vivo* en los cuales las células se eliminan del hospedante (por ejemplo, un sujeto, como un paciente humano), se modifican y se colocan en el mismo u otro animal hospedante. Será evidente que uno puede utilizar cualquiera de las composiciones indicadas para introducir las construcciones de la invención, las proteínas / los polipéptidos o los ácidos nucleicos que los codifican, en las células tisulares en un contexto *ex vivo*. Los protocolos para métodos víricos, físicos y químicos de captación son bien conocidos en el arte.

Generación de anticuerpos

Los anticuerpos policlonales dirigidos a un polipéptido de antígeno, en general, se producen en los animales (por ejemplo, conejos, hámster, caprinos, ovinos, caballos, cerdos, ratas, gerbos, cobayos, ratones u otro mamífero apropiado, así como en otras especies no mamíferas) por medio de las inyecciones múltiples, subcutáneas o intraperitoneales, del polipéptido de antígeno, o un fragmento de éste, y un coadyuvante. Los coadyuvantes incluyen, sin limitación, el coadyuvante de Freund completo o incompleto, los geles minerales como el hidróxido de aluminio y las sustancias tensioactivas como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite y dinitrofenol. El BCG (bacilo Calmette-Guerin) y

Corynebacterium parvum son también coadyuvantes potencialmente útiles. Quizá sea útil conjugar un polipéptido de antígeno con una proteína portadora que es inmunógena en las especies a inmunizar; los portadores característicos incluyen hemocianina de Megathura crenulata (lapa californiana) [*keyhole limpet hemocyanin*], albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soya. Además, los agentes de la agregación, como el alumbre, se usan para mejorar la respuesta inmunitaria. Después de la inmunización, se sangran los animales y el suero se analiza para determinar el título del anticuerpo del polipéptido antiantígeno usando las técnicas convencionales. Los anticuerpos policlonales pueden utilizarse en los sueros de los cuales se detectaron, o puede purificarse de los sueros usando, por ejemplo, la cromatografía de afinidad con antígenos.

Se producen anticuerpos monoclonales dirigidos a los polipéptidos de antígeno usando cualquier método que prevea la producción de las moléculas del anticuerpo por las líneas celulares continuas en el cultivo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden elaborarse por el método de hibridoma según se describe en Kohler y colaboradores, Nature 256:495 [1975]; la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kosbor y colaboradores, *Immunol Today,* 4:72, 1983 ; Cote y colaboradores, *Proc Natl Acad Sci 80:* 2026-2030, 1983) y la técnica de EBV-hibridoma (Cole y colaboradores, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R Liss Inc, New York N.Y., páginas 77-96, (1985).

Cuando es empleada la técnica de hibridoma, pueden usarse las líneas celulares del mieloma. Las líneas celulares adecuadas para su empleo en los procedimientos de fusión que producen hibridoma, con preferencia, no producen anticuerpos endógenos, tienen una alta eficacia de fusión y exhiben deficiencias enzimáticas que las hacen incapaces de crecer en ciertos medios selectivos que sostienen el crecimiento de sólo las células fusionadas convenientes (hibridomas). Por ejemplo, donde el animal inmunizado es un ratón, pueden usarse P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1,

Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XX0 Bul; para ratas se pueden utilizar R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210; y U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6, que en todos los casos son de utilidad en relación con las fusiones celulares.

En una forma de realización alternativa, se pueden producir anticuerpos humanos a partir de bibliotecas de exhibición en fago (Hoogenboom y colaboradores, *J. Mol. Biol.* 227: 381 [1991]; Marks y colaboradores, *J. Mol. Biol.* 222: 581; ver, asimismo, la patente estadounidense número 5.885.793). Estos procesos imitan la selección inmune mediante la exhibición de los repertorios de anticuerpos en la superficie del bacteriófago filamentoso, y la selección posterior de fagos mediante su unión a un antígeno preferido. Dicha técnica se describe en la solicitud de PCT número PCT/US98/17364, depositada a nombre de Adams y colaboradores, que describe el aislamiento de anticuerpos de alta afinidad y agonistas funcionales para receptores MPL- y msk- usando tal enfoque. En este enfoque, puede crearse un repertorio completo de genes del anticuerpo humano por la clonación de genes V humanos reorganizados naturalmente reorganizado de los linfocitos de sangre periférica como ya se describió (Mullinax, y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87: 8095-8099 [1990]).

Alternativamente, un repertorio de cadena pesada humana enteramente sintético puede crearse a partir de segmentos de genes V no-reordenados, para lo cual se ensambla cada segmento VH humano con segmentos D de los nucleótidos aleatorios junto con un segmento humano J (Hoogenboom, y colaboradores, J. Mol. Biol. 227:381-388 [1992]). Del mismo modo, se puede construir un repertorio de cadena ligera combinando cada segmento V humano con un segmento J (Griffiths, et al, *EMBO J.* 13:3245-3260 [1994]). Los nucleótidos que codifican el anticuerpo completo (es decir, tanto la cadena pesada como ligera) están vinculados como un fragmento de Fv monocatenario y este polinucleótido se liga a un nucleótido que codifica una proteína

con cubierta del fago filamentoso. Cuando esta proteína de fusión se expresa en la superficie del fago, un polinucleótido que codifica un anticuerpo específico puede identificarse mediante la selección usando un antígeno inmovilizado.

Más allá de los métodos clásicos de generación de anticuerpos policlonales y monoclonales, se contempla cualquier método para generar cualquier forma conocida de anticuerpo. Además de policlonales y monoclonales, las formas del anticuerpo incluyen anticuerpos quimerizados, anticuerpos humanizados, anticuerpos con injerto de CDR y fragmentos y variantes del anticuerpo.

Variantes y derivados de agentes de enlace específicos

En un ejemplo, se proporcionan variantes de inserción en que uno o más residuos de aminoácidos complementan una secuencia específica de aminoácidos del agente de enlace. Las inserciones pueden ubicarse en cualquiera o en ambos de los extremos terminales de la proteína, o pueden ubicarse dentro de las regiones internas de la secuencia de aminoácidos del agente de enlace específico. Los productos de las variantes de la invención también incluyen productos del agente de enlace específico maduro, es decir, productos del agente de enlace específico en que se extraen las secuencias líderes o señales y la proteína resultante tiene residuos terminales amino adicionales. Los residuos adicionales del extremo amino terminal pueden derivarse de otra proteína, o pueden incluir uno o más residuos que no son identificables como derivados de una proteína específica. Se contemplan los polipéptidos con un residuo metionina adicional en la posición -1 (por ejemplo, Met-1-péptidos de enlace multivalentes con función efectora), como así también los polipéptidos de la invención con residuos metionina y lisina adicionales en las posiciones -2 y -1 (Met-2-Lys-1-proteínas de enlace multivalentes con función efectora). Las variantes de los polipéptidos de la invención que tienen residuos Met, Met-Lys, o Lys adicionales (o bien uno o más residuos más básicos en general) son particularmente útiles para la producción de proteínas recombinantes mejoradas en células hospedantes bacterianas.

La invención también comprende polipéptidos específicos de la invención que tienen residuos adicionales de aminoácidos que surgen del uso de sistemas de expresión específicos. Por ejemplo, el uso de los vectores comercialmente disponibles que expresan un polipéptido conveniente como parte de un producto de fusión glutatión-S-transferasa (GST) proporciona el polipéptido buscado que tiene un residuo glicina adicional en la posición -1 después de clivar el componente del GST del polipéptido conveniente. Las variantes que son el resultado de la expresión en otros sistemas de vectores también se contemplan, incluidas aquellas en las cuales las marcas de histidina se incorporan en la secuencia de aminoácidos, en general en el extremo carboxi y/o amino terminal de la secuencia.

En otro aspecto, la invención proporciona variantes de eliminación donde se eliminan uno o más residuos de aminoácidos en un polipéptido de la invención. Las eliminaciones pueden efectuarse en uno o ambos extremos terminales del polipéptido, o con la eliminación de uno o más residuos dentro de la secuencia de aminoácidos. Las variantes de eliminación incluyen, necesariamente, todos los fragmentos de un polipéptido según la invención.

Los fragmentos del anticuerpo se refieren a los polipéptidos que tienen una secuencia correspondiente a, al menos, parte de una secuencia de la región variable de inmunoglobulina. Pueden generarse fragmentos, por ejemplo, por clivado enzimático o químico de los polipéptidos correspondientes a anticuerpos de longitud completa. Otros fragmentos de enlace incluyen aquellos generados por las técnicas sintéticas o por las técnicas de ADN recombinante, como la expresión de los plásmidos recombinantes que contienen secuencias de ácidos nucleicos que codifican las regiones de variables del anticuerpo parcial. Los fragmentos preferidos del polipéptido muestran las propiedades inmunológicas únicas respecto -o específicas para- una diana, tal como se describe aquí. Los fragmentos de la invención que tienen las propiedades inmunológicas

deseadas pueden prepararse con cualquiera de los métodos bien conocidos y por lo común practicados en el arte.

Aún en otro aspecto, la invención proporciona variantes de sustitución de los polipéptidos de enlace multivalentes que tienen función efectora. Las variantes de sustitución incluyen aquellos polipéptidos en que uno o más residuos de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos se eliminan y reemplazan con residuos alternativos. En algunas formas de realización, las sustituciones son de naturaleza conservadora; sin embargo, la invención comprende las sustituciones que son no-conservadoras. Los aminoácidos pueden clasificarse según las propiedades físicas y la contribución a la estructura proteica secundaria y terciaria. Una sustitución conservadora se reconoce en el arte como la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades similares. En la Tabla A a continuación, se presentan ejemplos de sustituciones conservadores (ver la WO 97/09433, página 10, publicada el 13 de marzo de 1997 (PCT/GB96/02197, depositada el 6 de septiembre de 1996),

Tabla A

Sustituciones conservadoras I		
Cadena lateral	**Característica**	**Aminoácido**
Alifática	No-polar	G A P I L V
	Polar – no-cargada	S T M N Q
	Polar - cargada	D E K R
Aromática		H F W Y
Otra		N Q D E

Como alternativa, los aminoácidos conservadores pueden agruparse de la manera descripta por Lehninger, *[Biochemistry,* segunda edición; Worth Publishers, Inc. NY,: NY (1975), pp.71-77], según se indica en la Tabla B que consta a continuación.

Tabla B

Sustituciones conservadoras II		
Cadena lateral	**Característica**	**Aminoácido**
No-polar (hidrófoba)	A. Alifática	A L I V P
	B. Aromática	F W
	C. Con contenido de azufre	M
	D. Bajo potencial	G
No cargada-polar	A. Hidroxilo	S T Y
	B. Amidas	N Q
	C. Sulfidrilo	C
	D. Bajo potencial	G
Con carga positiva (básica)		K R H
Con carga negativa (ácida)		D E

Sustituciones conservadoras II		
Cadena lateral	**Característica**	**Aminoácido**
No-polar (hidrófoba)	A. Alifática	A L I V P
	B. Aromática	F W
	C. Con contenido de azufre	M

	D. Bajo potencial	G
No cargada-polar	A. Hidroxilo	S T Y
	B. Amidas	N Q
	C. Sulfidrilo	C
	D. Bajo potencial	G
Con carga positiva (básica)		K R H
Con carga negativa (ácida)		D E

La invención también proporciona derivados de polipéptidos de agentes de enlace específicos. Los derivados incluyen polipéptidos de agentes de enlace específicos, que tienen modificaciones fuera de la inserción, eliminación o sustitución de residuos de aminoácidos. Con preferencia, las modificaciones son de naturaleza covalente, e incluyen, por ejemplo, el enlace químico con polímeros, lípidos y otras fracciones orgánicas e inorgánicas. Los derivados de la invención pueden elaborarse de manera tal de aumentar la semivida circulante de un polipéptido del agente de enlace específico, o pueden diseñarse de manera tal de mejorar la capacidad de direccionamiento para el polipéptido a las células, los tejidos o los órganos previstos.

La invención también abarca las proteínas de enlace multivalentes con función efectora que están modificadas o derivadas de manera covalente, a fin de incluir una o más uniones de polímeros hidrosolubles, tal como polietilenglicol, polioxietilenglicol o polipropilenglicol, según se describe en las patentes estadounidenses números: 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 y 4.179.337. Otros polímeros de utilidad conocidos en el arte incluyen monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa, y

otros polímeros a base de carbohidratos, poli-(N-vinil pirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol) y alcohol polivinílico, al igual que mezclas de estos polímeros. En particular, se prefieren las proteínas derivadas de polietilenglicol (PEG). Se pueden enlazar los polímeros hidrosolubles en posiciones específicas, por ejemplo en el extremo terminal amino de las proteínas y polipéptidos según la invención, o bien unidos en forma aleatoria a una o más cadenas laterales del polipéptido. El uso de PEG para mejorar las capacidades terapéuticas se describe en la patente estadounidense número 6.133.426 concedida a González y colaboradores.

Sitios diana para la mutagénesis de inmunoglobulina

Existen ciertas estrategias para manipular las propiedades inherentes de una inmunoglobulina específica del antígeno (por ejemplo, un anticuerpo) que no están disponibles para las moléculas de enlace que no están basadas en inmunoglobulina. Un buen ejemplo de las estrategias que favorecen, por ejemplo, las moléculas basadas en anticuerpo sobre estas opciones, es la modulación *in vivo* de la afinidad de un anticuerpo por su diana mediante la maduración de afinidad, que aprovecha la hipermutación somática de los genes de inmunoglobulina para producir los anticuerpos de mayor afinidad a medida que avanza la respuesta inmunitaria. Además, se han desarrollado tecnologías recombinantes para alterar la estructura de las inmunoglobulinas y las regiones y los dominios de inmunoglobulina. Por lo tanto, los polipéptidos derivados de los anticuerpos pueden producirse de manera tal que exhiban afinidad alterada por un antígeno dado, y en el arte se conocen algunos protocolos de purificación y las pantallas de monitoreo para identificar y purificar o aislar estos polipéptidos. Usando estas técnicas conocidas, los polipéptidos que comprenden los dominios de enlace derivados de anticuerpo pueden obtenerse de manera que exhiban menor o mayor afinidad por un antígeno. Las estrategias para generar las variantes de polipéptido que presentan afinidad alterada incluyen el uso de la mutagénesis propia

del sitio o aleatoria del ADN que codifica el anticuerpo para cambiar los aminoácidos presentes en la proteína, seguido de un paso de tamizaje diseñado para recuperar las variantes del anticuerpo que presentan el cambio deseado, por ejemplo, mayor o menor afinidad en relación con el anticuerpo madre o referente no-modificado.

Los residuos de aminoácidos más comúnmente orientados en las estrategias mutagénicas para alterar la afinidad son los de la región determinante de la complementariedad (CDR) o la región hipervariable de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo. Estas regiones contienen los residuos que interactúan fisicoquímicamente con un antígeno, así como otros aminoácidos que afectan la disposición espacial de estos residuos. Sin embargo, también se ha demostrado que los aminoácidos en las regiones de entramado de los dominios variables fuera de las regiones CDR hacen contribuciones sustanciales a las propiedades de enlace con el antígeno de un anticuerpo y pueden orientarse para manipular tales propiedades. Ver Hudson, P. J., *Curr. Opin. Biotech.*, 9: 395-402 (1999) y las referencias que allí se citan.

Pueden producirse bibliotecas más pequeñas y más eficazmente sometidas a tamizaje de las variantes del anticuerpo mediante la restricción de la mutagénesis aleatoria o dirigida por el sitio a los sitios en las CDR que mantienen correspondencia con las áreas propensas a "hipermutación" durante el proceso de maduración de la afinidad somática. Ver Chowdhury, y colaboradores, *Nature Biotech.*, 17: 568-572 (1999) y las referencias que allí se citan. Los tipos de elementos de ADN conocidos para definir los sitios de hipermutación de esta manera incluyen repeticiones directas e invertidas, ciertas secuencias de consenso, las estructuras secundarias y palindromos. Las secuencias de ADN de consenso incluyen la secuencia tetrabásica purina-G-pirimidina-A/T (es decir, A o G - G - C o T – A o T) y el codón de serina AGY (donde Y puede ser C o T).

Por lo tanto, otro aspecto de la invención es un conjunto de estrategias mutagénicas para modificar la afinidad de un anticuerpo por su diana. Estas estrategias incluyen mutagénesis de toda la región variable de una cadena pesada y/o ligera, la mutagénesis de las regiones CDR solamente, la mutagénesis de los sitios de hipermutación de consenso dentro de las CDR, la mutagénesis de las regiones de entramado, o cualquier combinación de estos enfoques ("mutagénesis" en este contexto podría ser dirigida por el sitio o aleatoria). La delimitación definitiva de las regiones de CDR e identificación de los residuos que comprenden el sitio de enlace de un anticuerpo puede realizarse resolviendo la estructura del anticuerpo en cuestión, y el complejo anticuerpo:ligando, mediante las técnicas conocidas en el arte, como la cristalografía de rayos X. Los expertos en el arte conocen diversos métodos basados en el análisis y la caracterización de tales estructuras de cristal del anticuerpo y pueden ser empleados para aproximar las regiones CDR. Los ejemplos de tales métodos comúnmente usados incluyen las definiciones de Kabat, Chothia, AbM y de contacto.

La definición de Kabat se basa en la variabilidad de la secuencia y es la definición más comúnmente usada para predecir las regiones CDR. Johnson, y colaboradores, *Nucleic Acids Research*, 28: 214-8 (2000). La definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucle estructurales. (Chothia y colaboradores, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-17 [1986]; Chothia y colaboradores, Nature, 342: 877-83 [1989].) La definición de AbM es un punto intermedio entre las definiciones de Kabat y de Chothia. AbM es una suite integral de programas para el modelado de estructuras de anticuerpos producida por Oxford Molecular Group (Martin, y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci* (USA) 86:9268-9272 [1989]; Rees, y colaboradores, ABMTM, *a computer program for modeling variable regions of antibodies*, Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd.). La suite AbM modela la estructura terciaria de un anticuerpo a partir de una secuencia primaria utilizando una combinación de bases de datos de conocimientos y métodos ab initio. Recientemente, se introdujo una definición adicional, que se conoce

como la definición de contacto. Ver MacCallum y colaboradores, *J. Mol. Biol.*, 5:732-45 (1996). Esta definición se basa en un análisis de las estructuras de cristal complejas disponibles.

Por convención, los dominios CDR en la cadena pesada se denominan de manera característica H1, H2 y H3 y se numeran secuencialmente en orden yendo del extremo amino terminal al extremo carboxi terminal. Las regiones CDR en la cadena ligera se denominan de manera característica L1, L2 y L3 y se numeran secuencialmente en orden yendo del extremo amino terminal al extremo carboxi terminal.

La CDR-H1 tiene una longitud de 10 a 12 residuos, aproximadamente y, en general, comienza 4 residuos después de una Cys, según las definiciones de Chothia y AbM; o típicamente 5 residuos después, según la definición Kabat. Normalmente, a la H1 le sigue un Trp, normalmente Trp-Val, pero también Trp-Ile, o Trp-Ala. La longitud de H1 es de aproximadamente 10 a 12 residuos, según la definición de AbM; mientras que la definición Chothia excluye los 4 últimos residuos.

La CDR-H2 típicamente empieza 15 residuos después del fin de la H1, según las definiciones de Kabat y AbM. Los residuos que preceden la H2, típicamente, son Leu-Glu-Trp-Ile-Gly pero existe una cantidad de variantes. A la H2 típicamente le sigue la secuencia de aminoácidos Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala. Según la definición de Kabat, la longitud de H2 es de aproximadamente 16 a 19 residuos, donde la definición de AbM predice que la longitud, en general, será de 9 a 12 residuos.

La CDR-H3 comienza, de manera característica, 33 residuos después del final de H2 y está precedida, típicamente, por la secuencia de aminoácidos Cys-Ala-Arg. A la H3, típicamente, le sigue el aminoácido Gly. La longitud de H3 varía de 3 a 25 residuos.

La CDR-L1 empieza, aproximadamente, en el residuo 24 y en general sigue a una Cys. El residuo posterior a CDR-L1 siempre es Trp, y típicamente empieza en una

de las siguientes secuencias: Trp-Tyr-Gln, Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln, o Trp-Tyr-Leu. La CDR-L1 tiene una longitud aproximada de 10 a 17 residuos.

La CDR-L2 empieza aproximadamente 16 residuos después del final de L1. En general, sigue a los residuos Ile-Tyr, Val-Tyr, Ile-Lys o Ile-Phe. La CDR-L2 tiene una longitud aproximada de 7 residuos.

En general, la CDR-L3 empieza 33 residuos después del final de la L2 y suele ser posterior a una Cys. A la L3, en general, le sigue la secuencia de aminoácidos Phe-Gly-XXX-Gly. La L3 tiene una longitud aproximada de 7 a 11 residuos.

Diversos métodos para modificar los anticuerpos se han descripto en el arte, incluidos, por ejemplo, los métodos para producir anticuerpos humanizados donde la secuencia de la trama de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina humanizada es 65% a 95% idéntica a la secuencia de la trama de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina donante. Cada cadena de inmunoglobulina humanizada generalmente comprenderá, además de las CDR, los aminoácidos de la trama de inmunoglobulina donante que es, por ejemplo, capaz de interactuar con las CDR para efectuar la afinidad de enlace, tal como uno o más aminoácidos que están inmediatamente adyacentes a una CDR en la inmunoglobulina donante o aquellos dentro de 3 angstroms, aproximadamente, como lo predice el modelo molecular. Las cadenas pesada y liviana pueden diseñarse con el uso de cualquiera de todos los criterios. Cuando se combinan en un anticuerpo intacto, las inmunoglobulinas humanizadas son sustancialmente no-inmunógenas en los seres humanos y retienen sustancialmente la misma afinidad que la inmunoglobulina donante al antígeno, como una proteína u otro compuesto que contiene un epítopo.

En un ejemplo, se describen los métodos para la producción de los anticuerpos, y los fragmentos del anticuerpo, que tienen especificidad de enlace similar a un anticuerpo madre, pero que tienen mayores características humanas. Los anticuerpos humanizados se obtienen por mezclado de cadena, usando por ejemplo, la tecnología

de exhibición en fago y un polipéptido que comprende la región variable de la cadena ligera o pesada de un anticuerpo no-humano específico para un antígeno de interés, que luego se combina con un repertorio de regiones variables de la cadena (liviana o pesada) complementaria humana. Se identifican emparejamientos híbridas que son específicos para el antígeno de interés y las cadenas humanas de los emparejamientos seleccionados se combinan con un repertorio de los dominios variables complementarios humanos (pesado o liviano). En otra forma de realización, un componente de una CDR de un anticuerpo no humano se combina con un repertorio de partes componentes de las CDR de los anticuerpos humanos. De la biblioteca resultante de dímeros del polipéptido del anticuerpo, se seleccionan los híbridos, y pueden usarse en un segundo que paso de mezclado humanizante; como alternativa, este segundo paso se elimina si el híbrido es ya de carácter humano suficiente para tener valor terapéutico. Los métodos de modificación para aumentar el carácter humano se conocen en el arte.

Otro ejemplo es un método para hacer los anticuerpos humanizados al sustituir una secuencia de aminoácidos de la CDR por la secuencia correspondiente de aminoácidos de la CDR humana y/o al sustituir una secuencia de aminoácidos de FR por las secuencias correspondientes de aminoácidos de la FR humana.

Otro ejemplo proporciona métodos para identificar los residuos de aminoácidos de un dominio de la variable del anticuerpo que pueden modificarse sin disminuir la afinidad natural del dominio de enlace con el antígeno mientras se reduce su inmunogenicidad en lo que se refiere a una especie heteróloga y a métodos para preparar estas regiones variables del anticuerpo modificadas como de utilidad para la administración a la especie heteróloga.

La modificación de una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, por medio de cualquiera de los métodos conocidos en el arte está diseñada para lograr mayor o menor afinidad de enlace por un antígeno y/o para reducir la inmunogenicidad del

anticuerpo en el receptor y/o para modular los niveles de actividad efectora. En un enfoque, los anticuerpos humanizados pueden modificarse para eliminar los sitios glicosilación a fin de aumentar la afinidad del anticuerpo por su antígeno cognado (Co y colaboradores, *Mol. Immunol.* 30:1361-1367 [1993]). Las técnicas tales como "reshaping", "hiperquimerización" y "restauración con carillas / reconstitución", produjeron anticuerpos humanizados con mayor potencial terapéutico. Vaswami, y colaboradores, *Annals of Allergy, Asthma, & Immunol* 81:105 (1998); Roguska; y colaboradores, *Prot. Engineer.* 9:895-904 (1996)]. Ver, también, la patente estadounidense número 6.072.035, que describe métodos para la reconstitución de anticuerpos. Mientras estas técnicas disminuyen la inmunogenicidad del anticuerpo al reducir el número de residuos extraños, no previenen las respuestas antiidiotípicas y antialotípicas después de la administración repetida de los anticuerpos. Las opciones a estos métodos para reducir la inmunogenicidad se describen en Gilliland y colaboradores, *J. Immunol.* 62(6):3663-71 (1999).

En muchos casos, humanizar los anticuerpos resulta en una pérdida de la capacidad de enlace con el antígeno. Por consiguiente, es preferible "retromutar" el anticuerpo humanizado para incluir uno o más de los residuos de aminoácidos encontrados en el anticuerpo original (con mayor frecuencia roedor) en un intento por restaurar la afinidad de enlace del anticuerpo. Ver, por ejemplo, Saldanha y colaboradores, *Mol. Immunol.* 36:709-19 (1999).

Se ha demostrado que la glicosilación de las inmunoglobulinas afecta las funciones efectoras, la estabilidad estructural y la tasa de secreción de las células que producen anticuerpos (ver Leatherbarrow y colaboradores, *Mol. Immunol.* 22:407 (1985), que se incorpora a la presente por referencia). Los grupos de carbohidratos responsables de estas propiedades se unen en general a las regiones constantes de los anticuerpos. Por ejemplo, la glicosilación de IgG en Asn 297 en el dominio C_{H2} facilita la capacidad integral de la IgG para activar la citólisis dependiente del complemento

(Tao y colaboradores, *J. Immunol.* 143:2595 (1989)). La glicosilación de IgM en Asn 402 en el dominio C_{H3}, por ejemplo, facilita el ensamblaje adecuado y la actividad citolítica del anticuerpo (Muraoka y colaboradores, *J. Immunol.* 142:695 (1989)). La remoción de los sitios glicosilación en las posiciones 162 y 419 en los dominios C_{H1} y C_{H3} de un anticuerpo IgA condujo a la degradación intracelular y a la inhibición de la secreción del 90%, como mínimo (Taylor y colaboradores, Wall, Mol. Cell. Biol. 8:4197 (1988)). En consecuencia, las moléculas de la invención incluyen inmunoglobulinas mutacionalmente alteradas que presentan patrones de glicosilación alterados mediante la mutación de residuos específicos en, por ejemplo, una subregión constante para alterar la función efectora Ver Co y colaboradores, *Mol. Immunol.* 30:1361-1367 (1993); Jacquemon y colaboradores, *J. Thromb. Haemost.* 4:1047-1055 (2006); Schuster y colaboradores, *Cancer Res.* 65:7934-7941 (2005); y Warnock y colaboradores, *Biotechnol Bioeng.* 92:831-842 (2005), que en todos los casos se incorporan a la presente a modo de referencia.

La invención también incluye moléculas de enlace multivalentes con al menos un dominio de enlace que tiene una secuencia 80%, como mínimo, preferentemente 90% ó 95% ó 99% idéntica a la secuencia de la región variable de inmunoglobulina conocida, y que tiene al menos un residuo que es diferente de tal región variable de inmunoglobulina, donde el residuo cambiado agrega un sitio de glicosilación, cambia la ubicación de uno o más sitios de glicosilación, o extrae preferentemente un sitio de glicosilación en relación con la región variable de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el cambio elimina un sitio de glicosilación N-enlazado en una trama de la región variable de inmunoglobulina, o elimina un sitio de glicosilación N-enlazado que se produce en la trama de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina, en la región que abarca desde el residuo de aminoácido 65 al residuo de aminoácido 85, aproximadamente, usando la convención de numeración de Co y colaboradores, *J. Immunol.* 148: 1149, (1992).

Cualquier método conocido en el arte se contempla para producir las moléculas de enlace multivalentes que presentan los modelos glicosilación alterados en relación con una secuencia referente de inmunoglobulina. Por ejemplo, cualquiera de una variedad de técnicas genéticas puede ser empleada para alterar uno o más residuos particulares. Alternativamente, las células hospedantes usadas para la producción pueden diseñarse por técnicas de ingeniería genética para producir el patrón de glicosilación alterado. Un método conocido en el arte, por ejemplo, proporciona glicosilación alterada en forma de variantes bisecadas, no-fucosiladas que aumentan la ADCC. Las variantes son el resultado de la expresión en una célula hospedante que contiene una enzima que modifica un oligosacárido. Alternativamente, la tecnología de Potelligent de BioWa/Kyowa Hakko se contempla para reducir el contenido de fucosa de las moléculas glicosiladas según la invención. En un método conocido, se proporciona una célula hospedante CHO para la producción de inmunoglobulina recombinante que modifica el patrón de glicosilación de la región F_C de la inmunoglobulina, mediante la producción de GDP-fucosa. Esta tecnología está disponible para modificar el patrón de glicosilación de una subregión constante de una molécula de enlace multivalente según la invención.

Además de modificar las propiedades de enlace de los dominios de enlace, como los dominios de enlace de las inmunoglobulinas, y además de tales modificaciones como humanización, la invención comprende la modulación de la función efectora cambiando o mutando los residuos contribuyentes a la función efectora, como la función efectora de una subregión constante. Estas modificaciones pueden efectuarse usando cualquier técnica conocida en el arte, como el enfoque que se revela en Presta y colaboradores, *Biochem. Soc. Trans.* 30:487-490 (2001), que se incorpora a la presente por referencia. Los ejemplos de enfoques incluyen el uso del protocolo revelado en Presta y colaboradores, para modificar los residuos específicos, de los que conoce su

capacidad de afectar el enlace en una o más subregiones constantes correspondientes a FCγRI, FCγRII, FCγRIII, FCαR y FCεR.

En otro enfoque, se dispone de la tecnología Xencor XmAb para diseñar por técnicas de ingeniería genética las subregiones correspondientes a los dominios F_C para mejorar la función efectora de destrucción celular. Ver Lazar y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (USA) 103(11):4005-4010 (2006), que se incorpora a la presente a modo de referencia. Usando este enfoque, por ejemplo, se pueden generar subregiones constantes optimizadas para la especificidad y el enlace FCγR, de ese modo mejorando la función efectora de destrucción de células.

Producción de proteínas de enlace multivalentes con función efectora

Una variedad de sistemas de vectores de expresión/hospedantes pueden utilizarse para contener y expresar la proteína de enlace multivalente (con función efectora) de la invención. Estos sistemas incluyen pero no se limitan a los microorganismos como las bacterias transformadas con bacteriófagos, plásmidos, cósmidos recombinantes u otros vectores de expresión; la levadura transformada con vectores de expresión de levadura o de lanzadera; los sistemas de células de insectos infectadas por vectores de expresión vírica (por ejemplo, baculovirus); los sistemas de células vegetales transfectados con vectores de expresión vírica (por ejemplo, el virus del mosaico del coliflor, CaMV; el virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión bacteriana (por ejemplo, Ti o plásmido pBR322); o los sistemas de células de animales. Las células mamíferas que son útiles en las producciones de proteínas de enlace multivalentes recombinantes incluyen, pero no se limitan a, células VERO, células HeLa, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), células COS (tal como COS-7), W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 y las células HEK293. Los ejemplos de protocolos para la expresión recombinante de la proteína de enlace multivalente se describen aquí a continuación.

Una vector de expresión puede comprender una unidad de transcripción que comprende un ensamblaje de (1) uno o más elementos genéticos que tienen una función reguladora en la expresión génica, por ejemplo, un promotor, mejorador o sitio de enlace específico del factor; (2) una estructura o secuencia que codifica el agente de enlace que se transcribe en ARNm y se traduce en la proteína; y (3) secuencias apropiadas de inicio y terminación de la transcripción. Las unidades estructurales destinadas al uso en sistemas de expresión eucariota o de levadura, preferentemente incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula hospedante. Alternativamente, donde la proteína de enlace multivalente recombinante se expresa sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un residuo de metionina en el extremo amino terminal. Este residuo puede o no clivarse posteriormente de la proteína recombinante expresada para proporcionar una proteína de enlace multivalente final.

Por ejemplo, las proteínas de enlace multivalentes pueden expresarse recombinantemente en la levadura usando un sistema de expresión comercialmente disponible, como es el caso de Pichia Expressión System (Invitrogen, San Diego, CA), respetando las instrucciones del fabricante, Este sistema también depende de la secuencia pre-pro-alfa para dirigir la secreción, pero la transcripción del inserto es impulsada por el promotor oxidasa de alcohol (AOX1) sobre la inducción por metanol. El péptido de enlace multivalente secretado puede purificarse del medio de crecimiento de levadura con, por ejemplo, los métodos usados para purificar el péptido de los sobrenadantes de células bacterianas y mamíferas.

Alternativamente, el ADNc que codifica el péptido de enlace multivalente puede clonarse en el vector de expresión de baculovirus pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA). Este vector puede usarse según las instrucciones del fabricante (PharMingen) para infectar las células Spodoptera frugiperda en el medio SF9 aproteico y para producir proteína recombinante. La proteína de enlace multivalente puede purificarse y

concentrarse del medio usando una columna de heparina-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ). Los sistemas de insectos para la expresión de proteínas, como el sistema SF9, son bien conocidos por los expertos en el arte. En tal sistema, el virus de Autographa californica de la polihedrosis nuclear (AcNPV) puede usarse como un vector para expresar los genes extraños en las células *Spodoptera frugiperda* o en larvas Trichoplusia. La secuencia de codificación de péptidos de enlace multivalentes puede clonarse en una región no-esencial del virus, como el gen polihedrina, y colocarse bajo control del promotor de polihedrina. La inserción satisfactoria del péptido de enlace multivalente tornará el gen de polihedrina inactivo, y producirá el virus recombinante sin recubrimiento proteico. Los virus recombinantes pueden usarse para infectar las células S. frugiperda o las larvas de Trichoplusia en las cuales péptido se expresa (Smith y colaboradores, *J Virol* 46: 584, 1983; Engelhard y colaboradores, *Proc Nat Acad Sci* (USA) 91: 3224-7, 1994).

En otro ejemplo, la secuencia de ADN que codifica el péptido de enlace multivalente puede ser amplificada por PCR y clonarse en un vector apropiado, por ejemplo, pGEX-3X (Pharmacia, Piscataway, NJ). El vector pGEX está diseñado para producir una proteína de fusión que comprende glutatión-S-transferasa (GST), codificada por el vector y una proteína de enlace multivalente codificada por un fragmento de ADN insertado en el sitio de clonación del vector. Los cebadores para la PCR pueden generarse para incluir por ejemplo, un sitio de clivado apropiado. Donde la fracción de fusión de la proteína de enlace multivalente se usa exclusivamente para facilitar la expresión o no es aconsejable como una unión al péptido de interés, la fusión de la proteína de enlace multivalente recombinante puede clivarse de la porción de GST de la proteína de fusión. La construcción del péptido de enlace multivalente/pGEX-3X se transforma en células *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla CA), y los transformantes individuales se aíslan y crían. ADN plásmido de transformantes individuales se purifica y puede secuenciarse parcialmente usando un secuenciador

automatizado para confirmar la presencia del ácido nucleico que codifica la proteína de enlace multivalente en la orientación correcta.

La proteína de enlace multivalente fusionada, que puede producirse como un cuerpo de inclusión insoluble en las bacterias, puede purificarse del siguiente modo. Las células hospedantes pueden cosecharse mediante centrifugación; lavarse en 0,15 M de NaCl; 10 mM de Tris, a pH 8; 1 mM de EDTA; y tratarse con 0,1 mg/ml de lisozima (Sigma Chemical Co.) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El lisado puede ser purificado por sonicación, y el desecho de células puede peletearse mediante centrifugación durante 10 minutos a 12.000 X g. El pellet que contiene fusiones de la proteína de enlace multivalente puede resuspenderse en 50 mM de Tris mM, a pH 8 y 10 mM de EDTA; distribuirse en capas sobre 50% de glicerol; y centrifugarse durante 30 minutos a 6000 *g*. El pellet puede resuspenderse en la solución salina amortiguada con fosfato estándar (PBS) libre de Mg^{++}y Ca^{++}. La fusión de proteína de enlace multivalente puede purificarse, aún más, mediante el fraccionamiento del pellet resuspendido en gel de poliacrilamida SDS desnaturalizante (Sambrook y colaboradores). El gel se embebe en 0,4 M de KCl para visualizar la proteína, que se extirpa y se electroeluye en solución amortiguadora de corrida en gel sin SDS. Si la proteína de fusión del péptido de enlace multivalente/GST se produce en bacterias como una proteína soluble, puede purificarse con el empleo del módulo de purificación GST (Pharmacia Biotech).

La fusión de la proteína de enlace multivalente se somete preferentemente a digestión para clivar el GST del péptido de enlace multivalente de la invención. La reacción de digestión (20 - 40 µg de proteína de fusión, 20 - 30 unidades de trombina humana (4000 U/mg (Sigma) en 0,5 ml de PBS) puede incubarse durante 16 a 48 horas a temperatura ambiente y cargarse en un gel SDS-PAGE desnaturalizante para fraccionar los productos de reacción. El gel puede remojarse en 0,4 M de KCl para visualizar las bandas proteicas. La identidad de la banda proteica correspondiente al peso molecular esperado del péptido de enlace multivalente puede confirmarse

mediante el análisis de secuencias de aminoácidos usando un secuenciador automatizado (Applied Biosystems Model 473A, Foster City, CA). Alternativamente, la identidad puede confirmarse al realizar la HPLC y/o la espectrometría de masa de los péptidos.

Como alternativa, una secuencia de ADN que codifica el péptido de enlace multivalente puede clonarse en un plásmido que contiene un promotor conveniente y, optativamente, una secuencia líder (ver, por ejemplo, Better y colaboradores, *Science*, 240:1041-43, 1988). La secuencia de esta construcción puede confirmarse mediante la secuenciación automatizada. El plásmido luego puede transformarse en una cepa *E. coli* apropiada, como la cepa MC1061, usando los procedimientos estándar en los que se emplea la incubación $CaCl_2$ y el tratamiento de choque térmico de las bacterias (Sambrook y colaboradores). Las bacterias transformadas pueden hacerse crecer en el medio LB complementado con carbenicilina u otra forma apropiada de selección, como se conoce en el arte, y la producción de la proteína expresada puede ser inducida por el crecimiento en un medio apropiado. Si está presente, la secuencia líder puede efectuar la secreción del péptido de enlace multivalente y clivarse durante la secreción. La proteína recombinante secretada puede purificarse del medio de cultivo de bacterias por los métodos descriptos a continuación.

Los sistemas hospedantes de mamífero para la expresión de la proteína recombinante son bien conocidos por los expertos en el arte y son los sistemas preferidos. Las cepas de la célula hospedante pueden elegirse por una capacidad particular de procesar la proteína expresada o producir ciertas modificaciones postraduccionales que serán útiles porque proporcionan actividad proteica. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a: acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Diferentes células hospedantes, tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, y similares, tienen maquinaria celular específica y los mecanismos característicos específicos para tales actividades postranslacionales y

pueden elegirse para asegurar la modificación correcta y el procesamiento adecuado de la proteína extraña.

Es preferible que las células transformadas se usen para la producción de proteínas a largo plazo, con alto rendimiento y, como tal, la expresión estable es aconsejable. Una vez que tales células se transforman con vectores que contienen preferentemente al menos un marcador seleccionable junto con el casete de expresión conveniente, las células se crían durante 1-2 días en un medio enriquecido antes del cambio al medio selectivo. El marcador seleccionable está diseñado para conferir resistencia a la selección y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de las células que expresan con éxito la proteína extraña. Pueden proliferar los grumos resistentes de las células establemente transformadas usando las técnicas de cultivo tisular apropiadas para la célula.

Varios sistemas de selección pueden usarse para recuperar las células que se han transformado para producir proteínas recombinantes. Tales sistemas de selección incluyen, pero no se limitan a, quinasa timidina de HSV, fosforibosiltransferasa de hipoxantina-guanina y genes de fosforibosiltransferasa de adenina, en células tk-, hgprt- o aprt -, respectivamente. Además, la resistencia anti-dianabolita puede usarse como la base de la selección para dhfr, que confiere resistencia al metotrexato; gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico; neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G418 y confiere resistencia a clorosulfurón; e higro, que confiere resistencia a la higromicina Los genes seleccionables adicionales que pueden ser útiles incluyen trpB, que permite a las células utilizar el indol en lugar del triptófano, o hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina. Los marcadores que dan una indicación visual para la identificación de transformantes incluyen antocianinas, β- glucuronidasa y su sustrato, GUS y la luciferasa y su sustrato, luciferina.

Purificación de proteínas

Las técnicas de purificación de proteínas son bien conocidas por el experto en el arte. Estas técnicas incluyen, en un nivel, el fraccionamiento en crudo del polipéptido y fracciones no-polipeptídicas. Habiendo separado el polipéptido de enlace multivalente de, al menos, otra proteína, el polipéptido de interés se purifica, pero habitualmente se prefiere realizar una purificación adicional usando las técnicas cromatográficas y electroforéticas para lograr purificación parcial o completa (o purificación hasta la homogeneidad). Los métodos analíticos particularmente convenientes para la preparación de un péptido de enlace puramente multivalente son cromatografía por intercambio de iones, cromatografía de exclusión; electroforesis en gel de poliacrilamida; y enfoque isoeléctrico. Los métodos particularmente eficaces de purificación de los péptidos son la cromatografía en fase líquida rápida de proteínas y la HPLC.

Ciertos aspectos de la presente invención se refieren a la purificación, y en las formas de realización particulares, a la purificación sustancial, de una proteína o un péptido de enlace multivalente codificado. El término "proteína o péptido de enlace multivalente purificado", tal como se lo usa aquí, se refiere a una composición, aislable de otros componentes, donde la proteína o el péptido de enlace multivalente se purifica en cualquier grado respecto de su estado natural. Una proteína o péptido de enlace multivalente purificado, por consiguiente, también se refiere a una proteína o el péptido de enlace multivalente, libre del entorno en el cual puede existir en forma natural.

En general, "purificado refiere a una composición de proteínas de enlace multivalentes que se ha sometido al fraccionamiento para eliminar otros componentes y la composición retiene sustancialmente su actividad biológica expresada. Donde se usa el término "sustancialmente purificado", esta designación se refiere a una composición de proteínas de enlace multivalentes en la cual la proteína o el péptido de enlace multivalente forma el componente principal de la composición, por ejemplo

constituye un 50%, un 60%, un 70%, un 80%, un 90%, un 95%, un 99% en peso o más, aproximadamente, de la proteína en la composición.

El experto en el arte conoce diversos métodos para cuantificar el grado de purificación de la proteína de enlace multivalente considerando la presente revelación. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad de enlace específica de una fracción activa o evaluar la cantidad de polipéptidos de enlace multivalentes dentro de una fracción por análisis de SDS/PAGE. Un método preferido para evaluar la pureza de una fracción de proteínas de enlace multivalentes es calcular la actividad de enlace de la fracción, compararla con la actividad de enlace del extracto inicial y, así, calcular el grado de purificación, aquí evaluado por un "-veces el número de purificación". Las unidades reales que se usan para representar la cantidad de actividad de enlace, desde luego, dependerán de la técnica de ensayo particular de análisis elegida para seguir a la purificación y de sí la proteína o el péptido de enlace multivalente expresado presenta una actividad de enlace detectable.

Diversas técnicas apropiadas para uso en la purificación de proteínas de enlace multivalentes son bien conocidas por los expertos en el arte. Estos incluyen, por ejemplo, la precipitación con sulfato de amonio, PEG, los anticuerpos y similares, o por la desnaturalización por calor, seguido de centrifugación; pasos decromatografía, tal como cromatografía por intercambio de iones, filtración en gel, en fase inversa, hidroxilapatita y de afinidad; enfoque isoeléctrico; electroforesis en geles; y las combinaciones de éstas y otras técnicas. Según se sabe en general en el arte, se cree que es posible alterar el orden de los diversos pasos de purificación, o que ciertos pasos pueden omitirse, y aún así puede obtenerse un método apropiado para la preparación de una proteína de enlace multivalente sustancialmente purificada.

No hay ningún requisito general que indique que la proteína de enlace multivalente siempre debe proporcionarse en su estado más purificado. En efecto, se contempla que las proteínas de enlace menos sustancialmente multivalentes tendrán

utilidad en ciertas formas de realización. La purificación parcial puede realizarse usando menos pasos de purificación en combinación, o al utilizando diferentes formas del mismo esquema general de purificación. Por ejemplo, se aprecia que una cromatografía en columna por intercambio de cationes realizada utilizando un aparato de HPLC, en general, dará lugar a mayor purificación que la misma técnica utilizando un sistema de cromatografía de baja presión. Los métodos que presentaban un grado inferior de purificación relativa pueden tener ventajas en cuanto a la recuperación total del producto de proteínas de enlace multivalentes, o para mantener la actividad de enlace de una proteína de enlace multivalente expresada.

Se sabe que la migración de un polipéptido puede variar, a veces significativamente, con diferentes condiciones de SDS/PAGE (Capaldi y colaboradores, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 76:425, 1977). Por consiguiente, se apreciará que bajo diferentes condiciones de electroforesis pueden variar los pesos moleculares evidentes de productos de expresión de proteínas de enlace multivalentes parcialmente purificadas.

Células efectoras

Las células efectoras para inducir, por ejemplo, ADCC, ADCP (fagocitosis celular dependiente de anticuerpos), y demás, contra una célula diana incluyen leucocitos humanos, macrófagos, monocitos, neutrófilos activados, células asesinas naturales activadas (NK) y eosinófilos. Las células efectoras expresan $F_C\alpha R$ (CD89), FcγRI, FcγRII, FcγRIII, y/o $F_C\varepsilon R1$ e incluyen, por ejemplo, monocitos y neutrófilos activados. Se encontró, por ejemplo, que la expresión de FcγRI es regulada en forma ascendente por el interferón gamma (IFN-γ). Esta expresión mejorada aumenta la actividad citotóxica de los monocitos y los neutrófilos contra las células diana. En tal sentido, las células efectoras pueden activarse con (IFN-γ) u otras citoquinas (por ejemplo, TNF-α o β, factor estimulador de colonias, IL-2) para aumentar la presencia de FcγRI en la

superficie de las células antes de contactarse con una proteína multivalente de la invención.

Las proteínas multivalentes de la invención proporcionan una función efectora del anticuerpo, como la citotoxicidad mediada por células efectoras dependientes de anticuerpos (ADCC), que se usan contra una célula diana. Las proteínas multivalentes con función efectora son administradas solas, según se indica aquí, o después de acoplarse a una célula efectora, de ese modo formando una "célula efectora activada". Una "célula efectora activada" es una célula efectora, según se define aquí, enlazada a una proteína multivalente con función efectora, también como definió aquí, de tal manera que a la célula efectora se le proporciona eficazmente una función de direccionamiento antes de la administración.

Las células efectoras activadas se administran *in vivo* como una suspensión de las células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administradas se encuentra en el orden de 10^8-10^9, pero variará según la finalidad terapéutica. En general, la cantidad será suficiente para obtener la localización de la célula efectora en la célula diana, y para proporcionar un nivel deseado de la función de células efectoras en ese lugar, como la destrucción de células por ADCC y/o fagocitosis. El término "solución fisiológicamente aceptable", como se usa aquí, está concebido para incluir cualquier solución portadora que estabilice las células efectoras dirigidas para la administración *in vivo* que incluye, por ejemplo, las soluciones salinas y soluciones amortiguadoras acuosas, los solventes, los agentes antibacterianos y antifúngicos, los agentes isotónicos y demás.

En consecuencia, otro aspecto de la invención proporciona un método para inducir una función efectora específica del anticuerpo, como ADCC, contra una célula en un sujeto, que comprende administrarle al sujeto una proteína multivalente (o ácido nucleico codificante) o célula efectora activada en un medio fisiológicamente aceptable. Las vías de administración pueden variar y las vías de administración apropiadas serán

40

determinadas por los expertos en el arte según una consideración de variables y procedimientos corrientes específicos de casos, según se conoce en el arte.

Efectos acelulares

Las moléculas multivalentes de la invención también proporcionan efectos acelulares, por ejemplo al proporcionar funcionalidad CDC. El sistema del complemento es una cascada bioquímica del sistema inmunitario que ayuda a eliminar las sustancias extrañas, tales como los agentes patógenos de un organismo. Deriva de muchas proteínas pequeñas de plasma que funcionan en conjunto al inducir citólisis de una célula diana, porque alteran la membrana plasmática de la célula diana. El sistema del complemento consta de más de 35 proteínas soluble enlazadas a la célula, 12 de las cuales están directamente involucradas en las trayectorias del complemento. Las proteínas son activas en tres trayectorias bioquímicas que llevan a la activación del sistema del complemento: la trayectoria del complemento clásica, la trayectoria del complemento alternativa y la trayectoria de lectina que se enlaza a manosa. Los anticuerpos, en particular la clase IgG1, también pueden "fijar" el complemento. En el arte se comprenden estas trayectorias y no se repetirán aquí, pero vale la pena señalar que la citotoxicidad dependiente del complemento no depende de la interacción de una molécula de enlace con una célula, por ejemplo, un linfocito B, del sistema inmunitario. También es conveniente destacar que el sistema del complemento es regulado por las proteínas que regulan el complemento. Estas proteínas están presentes en mayores concentraciones en el plasma de la sangre que complementan las proteínas. Las proteínas que regulan el complemento se encuentran en las superficies de autocélulas, lo que proporciona un mecanismo para evitar que las autocélulas sean el objeto de proteínas del complemento. Se estima que el sistema de complemento juega un rol en varias enfermedades con un componente inmunitario, tal como el síndrome de Barraquer-Simons, mal de Alzheimer, asma, lupus eritematoso, varias formas de artritis, insuficiencia cardíaca auto-inmunitaria y esclerosis múltiple. Las deficiencias en la vía

terminal predisponen a un individuo tanto a enfermedades auto-inmunitarias como a infecciones (en especial, la meningitis).

Enfermedades, trastornos y afecciones

La invención proporciona proteínas de enlace multivalentes con función efectora y sus variantes y derivados, que se enlazan a uno o más compañeros de enlace y aquellos casos de enlace son útiles en el tratamiento, la prevención o el alivio de un síntoma asociado con una enfermedad, un trastorno o una patología, preferentemente que aflige a los seres humanos. En las formas de realización preferidas de estos métodos, la proteína de enlace multivalente (y multiespecífica) con función efectora asocia una célula que lleva una diana, como un marcador de superficie celular específico de tumores, con una célula efectora, tal como una célula del sistema inmunitario que exhibe actividad citotóxica. En otras formas de realización, la proteína de enlace multivalente, multiespecífica y con función efectora se enlaza específicamente a dos diferentes marcadores de superficie celular específicos de la enfermedad, el trastorno o la afección, a fin de asegurar que la diana correcta se asocie con una célula efectora, tal como una célula citotóxica del sistema inmunitario. Además, la proteína de enlace multivalente con función efectora puede usarse para inducir o aumentar la actividad del antígeno, o para inhibir la actividad del antígeno. Las proteínas de enlace multivalentes con función efectora son también apropiadas para las terapias combinadas y los regímenes paliativos.

En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones y métodos útiles para tratar o prevenir enfermedades y afecciones caracterizadas por los niveles aberrantes de la actividad de antígeno asociado con una célula. Estas enfermedades incluyen cánceres y otras afecciones hiperproliferativas, tal como la hiperplasia, la soriasis, la dermatitis por contacto, los trastornos inmunológicos y la infertilidad. Una variedad amplia de los cánceres, incluidos los tumores sólidos y las leucemias son tratables con las composiciones y métodos revelados aquí. Los tipos del cáncer que se

pueden tratar incluyen, sin limitación: adenocarcinoma de mama, próstata y colon; todas las formas de carcinoma broncogénico del pulmón; mieloide; melanoma; hepatoma; neuroblastoma; papiloma; apudoma; coristoma; branquioma; síndrome carcinoide maligno; cardiopatía carcinoide; carcinoma (por ejemplo, tumor de Walker, de linfocitos Basales, basoescamoso, de Brown-Pearce, ductal, de Ehrlich, Krebs 2, de células de Merkel, carcinoma mucinoso, cáncer de pulmón de células no-pequeñas, de célula en grano de avena, papilar, escirroso, bronquiolar, broncogénico, escamocelular y de células transitorias). Otros tipos de cánceres que se pueden tratar incluyen: trastornos histiocíticos; leucemia; histiocitosis maligna; enfermedad de Hodgkin; carcinoma inmunoproliferativo de pulmón de células pequeñas; linfoma no Hodgkin; plasmacitoma; reticuloendoteliosis; melanoma; condroblastoma; condroma; condrosarcoma; fibroma; fibrosarcoma; tumores de células gigantes; histiocitoma; lipoma; liposarcoma; mesotelioma; mixoma; mixosarcoma; osteoma; osteosarcoma; cordoma; craniofaringioma; disgerminoma; hamartoma; mesenquimoma; mesonefroma; miosarcoma; ameloblastoma; cementoma; odontoma; teratoma; timoma; tumor trofoblástico. Del mismo modo, los siguientes tipos de cánceres también se contemplan como susceptibles de tratamiento: adenoma; colangioma; colesteatoma; ciclindroma; cistadenocarcinoma; cistadenoma; tumor de células granulosas; ginandroblastoma; hepatoma; hidradenoma; tumor de células de los islotes; tumor de células de Leydig; papiloma; tumor de células de Sertoli; tumor de células de la teca; leiomioma; leiomiosarcoma; mioblastoma; mioma; miosarcoma; rabdomioma; rabdomiosarcoma; ependimoma; ganglioneuroma; glioma; meduloblastoma; meningioma; neurilemoma; neuroblastoma; neuroepitelioma; neurofibroma; neuroma; paraganglioma; paraganglioma no cromafínico. Los tipos de cánceres que se pueden tratar también incluyen, sin limitación: angioqueratoma; hiperplasia angiolinfoide con eosinofilia; angioma esclerosante; angiomatosis; glomangioma; hemangioendotelioma; hemoangioma; hemangiopericitoma; hemangiosarcoma; linfangioma; limfangiomioma;

linfangiosarcoma; pinealoma; carcinosarcoma; condrosarcoma; cistosarcoma filoide; fibrosarcoma; hemangiosarcoma; leiomiosarcoma; leucosarcoma; liposarcoma; linfangiosarcoma; miosarcoma; mixosarcoma; carcinoma ovárico; rabdomiosarcoma; sarcoma; neoplasias; nerofibromatosis; y displasia cervical. La invención también proporciona composiciones y métodos útiles en el tratamiento de otras afecciones en las cuales las células se han inmortalizado o se tornaron hiperproliferativas debido a la expresión anormalmente alta del antígeno.

Los ejemplos de los diversos trastornos proliferativos susceptibles a las composiciones y métodos de la invención son los cánceres de linfocitos B, que incluyen los linfomas de linfocitos B [tal como varias formas de la enfermedad de Hodgkin, linfoma no-Hodgkin (NHL, *por su sigla en inglés*), o linfomas del sistema nervioso central], leucemias [tal como leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células pilosas y leucemia mioblástica crónica], y mielomas (tal como mieloma múltiple). Otros cánceres de los linfocitos B incluyen: linfoma de linfocitos pequeños, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de la zona marginal esplénica, mieloma de células de plasma, plasmocitoma solitario de los huesos, plasmacitoma extraóseo, linfoma de linfocitos B de la zona marginal extra nodal de tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT, *por su sigla en inglés*), linfoma de linfocitos B de la zona marginal nodal, linfoma folicular, linfoma de las células del manto, linfoma de linfocitos B grandes difusos, linfoma de linfocitos B grandes de mediastino (tímico), linfoma de los linfocitos B grandes intravasculares, linfoma de efusión primaria, linfoma/leucemia de Burkitt, proliferaciones de los linfocitos B de potencial maligno incierto, granulomatosis linfomatoide y trastorno linfoproliferativo post-transplante.

Los trastornos caracterizados por la producción de auto-anticuerpos a menudo se consideran enfermedades auto-inmunitarias. Las enfermedades auto-inmunitarias incluyen las siguientes, sin limitación: artritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide

juvenil, osteoartritis, policondritis, artritis psoriásica, soriasis, dermatitis, polimiositis/dermatomiositis, miositis con cuerpos de inclusión, miositis inflamatoria, necrólisis epidérmica tóxica, esclerodermia sistémica y esclerosis, síndrome de Crest, respuestas asociadas con la enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de distrés respiratorio, síndrome de distrés respiratorio del adulto (ARDS, *por su sigla en inglés*), meningitis, encefalitis, uveítis, colitis, glomerulonefritis, afecciones alérgicas, eccema, asma, afecciones que incluyen la infiltración de los linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas, aterosclerosis, miocarditis autoinmunitaria, deficiencia de adhesión de leucocitos, lupus eritematoso sistémico (LES), lupus eritematoso cutáneo subagudo, lupus discoide, mielitis en asociación con lupus, cerebritis lúpica, diabetes de aparición juvenil, esclerosis múltiple, encefalomielitis alérgica, neuromielitis óptica, fiebre reumática, corea de Sydenham, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citoquinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis incluida la granulomatosis de Wegener y la enfermedad de Churg-Strauss, agranulocitosis, vasculitis (incluida la vasculitis/angeítis de hipersensibilidad, ANCA y vasculitis reumatoide), anemia aplástica, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica inmune incluida la anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA; *por su sigla en inglés*), anemia perniciosa, aplasia pura de glóbulos rojos (PRCA, *por su sigla en inglés*), deficiencia del factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmunitaria, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican la diapédesis de leucocitos, trastornos inflamatorios del sistema nervioso central (SNC), síndrome de lesiones de múltiples órganos, miastenia grave, enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, síndrome del anticuerpo antifosfolípido, neuritis alérgica, enfermedad de Behcet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, rechazo de trasplantes

de órganos sólidos, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD, *por su sigla en inglés*), penfigoide bulloso, pénfigo, poliendocrinopatías auto-inmunitarias, espondiloartropatías seronegativas, enfermedad de Reiter, síndrome del hombre rígido, arteritis de células gigantes, nefritis compleja inmune, nefropatia de IgA, polineuropatías de IgM o neuropatía mediada por IgM, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP, *por su sigla en inglés*), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP, *por si sigla en inglés*), púrpura de Henoch-Schonlein, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del testículo y el ovario incluida la orquitis autoinmune y la ooforitis, hipotiroidismo primario; enfermedades endocrinas auto-inmunitarias incluida la tiroiditis autoinmunitaria, la tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares auto-inmunitarios (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), diabetes de Tipo I también denominada diabetes mellitus dependiente de la insulina (DMDI) y síndrome de Sheehan; hepatitis autoinmunitaria, neumonitis intersticial linfoide (VIH), bronquiolitis obliterante (sin trasplante) vs. NSIP, síndrome de Guillain-Barre, vasculitis de vasos grandes (incluso polimialgia reumática y arteritis de células gigantes (Takayasu), vasculitis de vasos medios (incluida la enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nudosa), poliarteritis nudosa (PAN), espondilitis anquilosante, enfermedad de Berger (nefropatía de IgA), glomerulonefritis rápidamente progresiva, cirrosis biliar primaria, esprúe celíaco (enteropatía del gluten), crioglobulinemia, crioglobulinemia asociada con hepatitis, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), coronariopatía, fiebre mediterránea familiar, poliangeítis microscópica, síndrome de Cogan, síndrome de Whiskott-Aldrich y tromboangeítis obliterante.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica caracterizada por la inflamación de las articulaciones, lo cual deriva en hinchazón, dolor y pérdida de la función. Los pacientes que padecen AR durante un período prolongado usualmente exhiben destrucción progresiva de las articulaciones, deformidad, discapacidad e

incluso muerte prematura. Más allá de la AR, las enfermedades, las afecciones y los trastornos inflamatorios, en general, son susceptibles de someterse al tratamiento, la prevención o alivio de los síntomas (por ejemplo, calor, dolor, edema, enrojecimiento) asociados con el proceso de inflamación, y las composiciones y métodos de la invención son beneficiosos para tratar, prevenir o mejorar los procesos inflamatorios aberrantes o anormales, incluida la AR.

La enfermedad de Crohn y una enfermedad relacionada, la colitis ulcerosa, son dos categorías de enfermedades principales que pertenecen a un grupo de enfermedades denominado enfermedad inflamatoria intestinal (EII). La enfermedad de Crohn es un trastorno crónico que causa inflamación del tracto digestivo o gastrointestinal (GI). Si bien puede involucrar cualquier área del tracto GI desde la boca hasta el ano, comúnmente afecta el intestino delgado y/o el colon. En la colitis ulcerosa, el tracto GI sólo se ve involucrado a nivel del colon. La enfermedad de Crohn se puede caracterizar por anticuerpos contra los antígenos neutrófilos, es decir, el "anticuerpo anti-neutrófilos perinuclear" (pANCA, *por su sigla en inglés*), y contra Saccharomyces cervisiae, es decir "el anticuerpo anti-Saccharomyces cervisiae" (ASCA, *por su sigla en inglés*). Muchos pacientes con colitis ulcerosa tienen el anticuerpo pANCA en la sangre, pero no el anticuerpo ASCA, mientras que muchos pacientes con enfermedad de Crohn exhiben anticuerpos ASCA y no anticuerpos pANCA. Un método para evaluar la enfermedad de Crohn es utilizar el índice de la actividad de la enfermedad de Crohn (CDAI, *por su sigla en inglés*), basado en 18 puntuaciones variables predictoras recogidas por los médicos. Los valores del CDAI de 150 e inferiores se asocian con una enfermedad inactiva; los valores por encima de ese número indican una enfermedad activa, y los valores superiores a 450 se evidencian en la enfermedad extremadamente grave [Best y colaboradores, "*Development of a Crohn's disease activity index*", Gastroenterology 70:439-444 (1976)]. Sin embargo,

desde el estudio original, algunos investigadores utilizan un "valor subjetivo" de 200 a 250 como una puntuación de salud.

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmunitaria causada por recurrentes lesiones de los vasos sanguíneos en varios órganos, incluidos el riñón, la piel y las articulaciones. En pacientes que padecen LES, una interacción defectuosa entre los linfocitos T y los linfocitos B da como resultado la producción de auto-anticuerpos que atacan los núcleos celulares. Existe un acuerdo general de que los auto-anticuerpos son los responsables del LES, por ello las nuevas terapias que producen la depleción del linaje de los linfocitos B, lo cual permite que el sistema inmunitario se restablezca a medida que los precursores generan nuevos linfocitos B, ofrecen esperanza de un beneficio duradero a los enfermos de LES.

La esclerosis múltiple (EM) es, también, una enfermedad autoinmunitaria. Se caracteriza por la inflamación del sistema nervioso central y la destrucción de la mielina, lo cual aísla las fibras de las células nerviosas en el cerebro, la médula espinal y el organismo. Si bien se desconoce la causa de la EM, se cree ampliamente que los linfocitos T auto-inmunitarias hacen una contribución fundamental a la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, en el fluido cerebroespinal de los pacientes con EM están presentes elevados niveles de anticuerpos, y algunas teorías predicen que la respuesta de los linfocitos B que lleva a la producción de anticuerpos es importante para mediar la enfermedad.

La enfermedad tiroidea autoinmune es el resultado de la producción de auto-anticuerpos que estimulan la tiroides para provocar el hipertiroidismo (enfermedad de Graves) o destruyen la tiroides para provocar el hipotiroidismo (enfermedad de Hashimoto). La estimulación de la tiroides es provocada por los auto-anticuerpos que enlazan y activan el receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSH, *por su sigla en inglés*). La destrucción de la tiroides es provocada por los auto-anticuerpos que reaccionan con otros antígenos de la tiroides.

Otros trastornos, enfermedades y afecciones que pueden beneficiarse con las composiciones y los métodos de la invención incluyen el síndrome de Sjögren, que es una enfermedad autoinmune caracterizada por la destrucción de las glándulas productoras de la humedad corporal. Igualmente, la púrpura trombocitopénica inmunitaria (ITP, *por su sigla en inglés*) es causada por auto-anticuerpos que se enlazan a las plaquetas de la sangre y causan su destrucción, y para esta afección se pueden aplicar los materiales y métodos de la invención. La miastenia grave (MG) es un trastorno neuromuscular autoinmune crónico caracterizado por los auto-anticuerpos que se enlazan a los receptores acetilcolina expresados en las articulaciones neuromusculares que llevan a la debilidad de los grupos musculares voluntarios. Se trata de una enfermedad que tiene síntomas que se tratan con el empleo de la composición y los métodos de la invención, y se prevé que ésta resulte beneficiosa para tratar y/o prevenir esta enfermedad. Aún más, se prevé que las infecciones por el virus del sarcoma de Rous sean susceptibles al tratamiento o alivio de al menos un síntoma, con las composiciones y métodos de la invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al empleo de los materiales y métodos de la presente invención para prevenir y/o tratar cualquier afección hiperproliferativa de la piel, incluso la psoriasis y la dermatitis de contacto u otras enfermedades hiperproliferativas. La psoriasis se caracteriza por la inflamación autoinmune de la piel, y también se asocia con artritis en el 30% de los casos, al igual que la esclerodermia, la enfermedad inflamatoria intestinal, incluidas la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Se ha demostrado que los pacientes con psoriasis y dermatitis de contacto han elevado la actividad de antígeno dentro de estas lesiones (Ogoshi y colaboradores, *J. Inv. Dermatol.*, 110:818-23 [1998]). Las proteínas de enlace multivalentes y multiespecíficas pueden proporcionar una célula citotóxica del sistema inmunitario, por ejemplo, directamente a las células dentro de las lesiones que expresan altos niveles de antígeno. Las proteínas de enlace multivalentes, por ejemplo

multiespecíficas, pueden ser administradas subcutáneamente en los alrededores de las lesiones, o al usar cualquiera de las diversas vías de administración descriptas aquí y otras que el experto en el arte conoce perfectamente.

Asimismo, se contempla el tratamiento de la miopatía inflamatoria idiopática (MII), incluso la dermatomiositis (DM) y la polimiositis (PM). Las miopatías inflamatorias se categorizaron con el empleo de varios esquemas de clasificación. El esquema de clasificación de Miller (Miller, *Rheum Dis Clin North Am.* 1994, 20:811-826) identifica dos miopatías inflamatorias idiopáticas (MII), polimiositis (PM) y dermatomiositis (DM).

La polimiositis y la dermatomiositis son enfermedades inflamatorias crónicas y debilitantes que implican al músculo y, en el caso de la DM, a la piel. Se trata de trastornos poco frecuentes, con una incidencia anual informada de aproximadamente 5 a 10 casos por millón de adultos y 0,6 a 3,2 casos por millón de niños por año en los Estados Unidos (Targoff, *Curr Probl Dermatol.* 1991, 3:131-180). La miopatía inflamatoria idiopática se asocia con significativas morbilidad y mortalidad, donde se evidenció que hasta la mitad de los adultos afectados sufrieron importantes deterioros (Gottdiener y colaboradores, *Am J Cardiol.* 1978, 41:1141-49). Miller (*Rheum Dis Clin North Am.* 1994, 20:811-826 y *Arthritis and Allied Conditions*, Ch. 75, Eds. Koopman and Moreland, Lippincott Williams and Wilkins, 2005), establece cinco grupos de criterios utilizados para diagnosticar la MII, es decir, la evaluación según los criterios de miopatía inflamatoria idiopática (CMII), incluso debilidad muscular, evidencia de degeneración revelada en biopsia muscular, elevación de niveles de suero de las enzimas asociadas con músculos, tríada electromagnética de miopatía, evidencia de sarpullido en dermatomiositis, y también incluye evidencia de auto-anticuerpos como un criterio secundario.

Los factores asociados con la MII, incluso las enzimas asociadas con los músculos y los auto-anticuerpos incluyen, sin limitación: creatina quinasa (CK), lactato deshidrogenasa, aldolasa, proteína C reactiva, aspartato aminotransferasa (AST),

alanina aminotransferasa (ALT) y autoanticuerpo antinuclear (ANA), anticuerpos específicos para la miositis (MSA) y anticuerpo contra antígenos nucleares extraíbles.

Las enfermedades auto-inmunitarias preferidas que se pueden tratar con los métodos de la invención incluyen: enfermedad de Crohn, síndrome de Guillain-Barré (GBS, también conocido como polineuropatía desmielinizante inflamatoira, poliradiculoneuritis idiopática aguda, polineuritis idiopática aguda y parálisis ascendente de Landry), lupus eritematoso, esclerosis múltiple, miastenia grave, neuritis óptica, soriasis, artritis reumatoide, hipertiroidismo (por ejemplo, enfermedad de Graves), hipotiroidismo (por ejemplo, enfermedad de Hashimoto), tiroiditis de Ord (una tiroiditis similar a la enfermedad de Hashimoto), diabetes mellitus (tipo 1), anemia aplásica, síndrome de Reiter, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, síndrome de anticuerpos antifosfolípido (APS, *por su sigla en inglés*), síndrome de mioclonus opsoclonus (OMS, *por su sigla en inglés*), arteritis temporal (también conocida como "arteritis de células gigantes"), encefalomielitis difundida aguda (ADEM, *por su sigla en inglés*), síndrome de Goodpasture, granulomatosis de Wegener, la enfermedad celiaca, pénfigo, poliartritis canina, anemia hemolítica autoinmunitaria caliente. Además, la invención contempla los métodos para el tratamiento o el alivio de un síntoma asociado con las siguientes enfermedades: endometriosis, cistitis intersticial, neuromiotonia, esclerodermia, vitiligo, vulvodinia, enfermedad de Chagas que conduce a la cardiopatía chagásica (cardiomegalia), sarcoidosis, síndrome de fatiga crónica y disautonomia.

Se considera que el sistema de complemento juega un rol en muchas enfermedades con un componente auto-inmunitario, tal como en el mal de Alzheimer, asma, lupus eritematoso, varias formas de artritis, insuficiencia cardíaca autoinmune y esclerosis múltiple, que en todos los casos se consideran enfermedades, trastornos o afecciones que pueden tratarse o cuyos síntomas pueden aliviarse con el empleo de los métodos según la invención.

Se prefieren ciertas subregiones constantes, según la o las funciones efectoras en particular, que se exhibirán por medio de una molécula de enlace monocatenaria multivalente. Por ejemplo, se prefieren la IgG (IgG1, 2, o 3) e IgM para la activación del complemento, se prefiere la IgG de cualquier subtipo para la opsonización y la neutralización de toxinas; la IgA se prefiere para el enlace a agentes patógenos; y la IgE para el enlace de parásitos tales como gusanos.

A modo de ejemplo, los F_CRs que reconocen la región constante de los anticuerpos de IgG se han encontrado en los leucocitos humanos como tres tipos diferenciados de receptores Fcγ, que se pueden distinguir por las propiedades estructurales y funcionales, así como por las estructuras antigénicas detectadas por los anticuerpos monoclonales de CD. Se conocen como FcγRI, FcγRII y FcγRIII, y se expresan de manera diferenciada sobre (en superposición) conjuntos de leucocitos.

El FcgRI (CD64), un receptor de alta afinidad expresado en los monocitos, los macrófagos, los neutrófilos, los precursores mieloides y las células dendríticas, comprende las isoformas Ia y Ib. FcgRI tiene un alto grado de afinidad por la IgG1 e IgG3 humanas. Su afinidad por la IgG4 es, aproximadamente, 10 veces menor, mientras que no se enlaza a la IgG2. El FcgRI no muestra polimorfismo genético.

FcγRII (CD32), comprende las isoformas IIa, IIb1, IIb2, IIb3 y IIc, y es el tipo de FcγR humano más ampliamente distribuido, que se expresa en la mayoría de los tipos de leucocitos de la sangre, al igual que las células de Langerhans, células dendríticas y plaquetas. El FcγRII es un receptor de baja afinidad que sólo se enlaza a la IgG agregada. Es la única clase de FcγR que puede enlazarse a la IgG2. El FcγRIIa muestra polimorfismo genético, dando lugar a dos alotipos diferenciados, FcγRIIa-H131 y FcγRIIa-R131, respectivamente. Este polimorfismo funcional es atribuible a una única diferencia de aminoácidos: un residuo histidina (H) o arginina (R) en la posición 131, que es crítico para el enlace de la IgG. El FcγRIIa se enlaza fácil y rápidamente a la IgG

e IgG 3 humanas, y parece no enlazarse a la IgG4. El FcγRIIa-H131 tiene mucha mayor afinidad de enlace por la IgG2 en complejos, que el alotipo FcγRIIa-R131.

El FcγRIII (CD16) tiene dos isoformas o alelotipos, ambos con capacidad de enlazarse a la IgG1 y la IgG3. El FcγRIIa, con una afinidad intermedia para la IgG, se expresa en los macrófagos, los monocitos, las células asesinas naturales (NK) y los subconjuntos de linfocitos T. El FcγRIIIb es un receptor de afinidad baja por la IgG, selectivamente expresado en los neutrófilos. Es un receptor sumamente móvil con colaboración eficaz con otros receptores de la membrana. Los estudios con dímeros de IgG del mieloma han revelado que sólo las IgG1 e IgG3 se unen a FcγRIIIb (con afinidad baja), mientras que no se encontró ningún enlace a IgG2 e IgG4. El FcγRIIIb tiene polimorfismo co-dominante bi-alélico, los alotipos se designan NA1 (antígeno del neutrófilo) y NA2.

No obstante, otro aspecto de la invención es el uso de los materiales y métodos de la invención para combatir, tratar, prevenir o mitigar los efectos de la infección, resultante de cualquiera de una variedad amplia de agentes infecciosos. Las moléculas de enlace multivalentes, multiespecíficas de la invención están diseñadas para eficiente y eficazmente reclutar el sistema inmunitario del organismo hospedante para resistir la infección que surge de un organismo extraño, una célula extraña, un virus extraño o un objeto inanimado extraño. Por ejemplo, una molécula de enlace multiespecífica puede tener un dominio de enlace que se enlaza específicamente a diana en un agente infeccioso y otro dominio de enlace que se enlaza específicamente a una diana en una célula que presenta el antígeno, tal como CD 40, CD80, CD86, DC-SIGN, DEC-205, CD83, y similares. Alternativamente, cada dominio de enlace de una molécula de enlace multivalente puede unirse específicamente a un agente infeccioso, neutralizando de ese modo más eficazmente el agente. Asimismo, la invención contempla las moléculas de enlace multivalentes multiespecíficas, que se enlazan específicamente a una diana en un agente infeccioso y a un compañero de enlace no asociado a célula,

que puede ser eficaz conjuntamente con una función efectora de la molécula de enlace multiespecífica en el tratamiento o prevención de la infección que surge de un agente infeccioso.

Las células infecciosas contempladas por la invención incluyen cualquier célula infecciosa conocida, incluyendo sin carácter limitativo cualquiera de una variedad de bacterias (por ejemplo, *E. coli, S. typhimurium, P. aeruginosa, B. anthracis, C. botulinum, C. difficile, C. perfringens, H. pylori, V. cholerae* patógenos y otros), las micobacterias, el micoplasma, los hongos (incluida levadura y mohos) y los parásitos (incluido cualquier miembro parasitario conocido de protozoos, trematoda, el cestodos y nematoda). Los virus infecciosos incluyen, pero no se limitan a, los virus eucarióticos (por ejemplo, adenovirus, buniavirus, herpesvirus, papovavirus, paramixovirus, picornavirus, poxvirus, reovirus, retrovirus, y similares), así como bacteriófago. Los objetos extranjeros incluyen objetos que se introducen en un organismo, preferentemente un ser humano, independientemente de la modalidad de entrada e independientemente de si el daño es intencional. En vista de la mayor prevalencia de los agentes infecciosos polifármacorresistentes (por ejemplo, bacterias), particularmente como los agentes causantes de la infección nosocomial, los materiales y métodos de la invención, proporcionan un enfoque al tratamiento que evita las dificultades impuestas por mayor resistencia a los antibióticos.

Las enfermedades, las afecciones o los trastornos asociados con agentes infecciosos y susceptibles de tratamiento (profiláctico o terapéutico) con los materiales y métodos revelados aquí incluyen, pero no se limitan a: carbunco, aspergilosis, meningitis bacteriana, neumonía bacteriana (por ejemplo, neumonía por clamidia), blastomicosis, botulismo, brucelosis, candidiasis, cólera, ciccidioidomicosis, criptococosis, *E. coli* diarreico, enterohemorrágico o enterotoxigénico, difteria, muermo, histoplasmosis, legionelosis, lepra, listeriosis, nocardiosis, tos ferina, salmonelosis,

escarlatina, esporotricosis, faringoamigdalitis estreptocócica, síndrome de choque tóxico, diarrea de viajero y fiebre tifoidea.

Se podrán apreciar otros aspectos y detalles de la invención a partir de los siguientes ejemplos, cuyo fin es meramente ilustrativo y no limitativo. El Ejemplo 1 describe la clonación recombinante de regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de la inmunoglobulina. El Ejemplo 2 describe la construcción de productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños. El Ejemplo 3 describe la construcción de un casete prototipo para una proteína de enlace multivalente con función efectora. El Ejemplo 4 describe estudios de enlace y expresión con esta molécula prototipo inicial. El Ejemplo 5 describe la estructura de construcciones alternativas derivadas de esta molécula prototipo inicial donde se modificaron tanto la longitud como la secuencia de la secuencia de la región ligadora entre EFD y BD2. Además, describe las formas alternativas donde también se alteró la orientación de regiones V al unir el dominio 2. El Ejemplo 6 describe los estudios posteriores de enlace y funcionales sobre estas construcciones alternativas con formas ligadoras diferentes, identificando un clivado en la región ligadora en varias de estas formas derivadas, y las variantes de secuencias nuevas desarrolladas para abordar este problema. El Ejemplo 7 describe la construcción de una forma de realización preferida alternativa de las proteínas de fusión multivalentes multiespecíficas, donde tanto BD1 como BD2 se enlazan a los antígenos en el mismo tipo de células (CD20 y CD37), u otra proteína de fusión multiespecífica donde la especificidad de enlace con el antígeno para BD2 se ha cambiado a CD3 humana en vez de CD28. El Ejemplo 8 describe los estudios de enlace y funcionales realizados con las construcciones multiespecíficas CD20-hIgG-CD37. El Ejemplo 9 describe los estudios de enlace y funcionales realizados con las construcciones de proteínas de fusión multivalentes CD20-hIgG-CD3. El Ejemplo 10 revela moléculas de enlace multivalentes que tienen ligadores basados en regiones específicas de los dominios extracelulares de los miembros de la

superfamilia de inmunoglobulinas. El Ejemplo 11 revela ensayos para identificar los dominios de enlace de los cuales se espera eficacia sobre las moléculas de enlace multivalentes para lograr al menos un efecto beneficioso identificado en asociación con tales moléculas (por ejemplo, tratamiento de enfermedad).

Ejemplo 1

Clonación de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de la inmunoglobulina

Se puede utilizar cualquiera de los métodos conocidos en el arte para producir anticuerpos contra una diana antigénica dada. Del mismo modo, se pueden utilizar cualesquiera métodos conocidos en el arte para clonar las regiones variables de la cadena ligera y/o la cadena pesada de la inmunoglobulina, al igual que la subregión constante de un anticuerpo o de anticuerpos. El método que se describe a continuación constituye un ejemplo del método de clonación

A. Aislamiento de ARN total

Para clonar las regiones variables -o la subregión constante- de la cadena pesada y la cadena ligera de la inmunoglobulina, se aísla el ARN de las células de hibridoma que secretan el anticuerpo apropiado. Se lavan células ($2x10^7$) de la línea celular de hibridoma con 1x PBS y se peletean por centrifugación en un tubo de polipropileno de base redonda de 12 x 75 mm (Falcon número 2059). Se agrega a cada tubo reactivo para aislamiento de ARN total TRIzol™ (Gibco BRL, Life Technologies, número de catálogo 15596-018) (8 ml), y las células se lisan a través de pipeteado repetido. El lisado se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de agregar 1,6 ml (0,2 x volumen) de cloroformo, y se agita vigorosamente durante 15 segundos. Después de dejar reposar a temperatura ambiente durante 3 minutos, los lisados se centrifugan a 9.000 rpm durante 15 minutos en un rotor Beckman JA-17 preenfriado a 4°C, a fin de separar las fases acuosa y orgánica. La fase acuosa

superior (cerca de 4,8 ml) es transferida a un tubo nuevo y mezclada suavemente con 4 ml de isopropanol. Después de una incubación durante10 minutos a temperatura ambiente, el ARN se precipita mediante centrifugación a 9.000 rpm en rotor JA 17 durante 11 minutos y a una temperatura de 4°C. El pellet de ARN se lava con 8 ml de etanol helado al 75%, y se vuelve a peletear por centrifugación a 7.000 x rpm durante 7 minutos en un rotor 17-JA, a una temperatura de 4°C. Se decanta el lavado de etanol y los pellets de ARN se secan al aire durante 10 minutos. Los pellets de ARN se resuspenden en 150 µl de ddH_2O tratado con dietilpirocarbonato (DEPC) que contiene 1µl de inhibidor RNase (número de catálogo 799017; Boehringer Mannheim/Roche) por 1 ml de ddH_2O tratado con DEPC. Los pellets son resuspendidos mediante pipeteado suave y se incuban durante 20 minutos a 55°C. Las muestras de ARN se cuantifican por la medición del $OD_{260\ nm}$ de alícuotas diluidas (unidad 1 $OD_{260\ nm}$ = 40µg/ml de ARN).

B. Amplificación rápida de los extremos de ADNc

Se utilizó el sistema RACE 5'(amplificación rápida de fragmentos de ADNc) para amplificar los extremos de las regiones variables -o la subregión constante- de la cadena pesada o de la cadena ligera. Se utiliza el kit del sistema RACE 5'para amplificación rápida de los extremos de ADNc versión 2.0 (Life Technologies, número de catálogo 18374-058), según las instrucciones del fabricante. Los cebadores oligonucléotidos degenerados RACE 5'están diseñados para coincidir con, por ejemplo, las regiones constantes de dos clases comunes de cadenas pesadas de la inmunoglobulina de ratón (IgG1 e IgG2b) usando el programa de diseño de oligonucleótidos Oligo versión 5.1 (Molecular Biology Insights, Cascade CO). Los cebadores también están diseñados para coincidir con la región constante de la cadena ligera kappa de la IgG de ratón. Esta es la única clase de cadena ligera de inmunoglobulina, por ello no se necesita degeneración en el diseño de los cebadores. Las secuencias de los cebadores son las siguientes

Nombre	**Secuencia**	**SEQ ID NO**
GSP1 de la cadena pesada		
5'AGGTGCTGGAGGGGACAGTCACTGAGCTGC3'		7
Cadena pesada anidada		
5'GTCACWGTCACTGRCTCAGGGAARTAGC3'		8
(W = A ó T; R = A ó G)		
GSP1 de la cadena ligera		
5'GGGTGCTGCTCATGCTGTAGGTGCTGTCTTTGC3'		9
Cadena ligera anidada	5'CAAGAAGCACACGACTG	
AGGCACCTCCAGATG3'		10
Cebador de anclaje abreviado RECE 5'		
5'GGCCACGCGTCGACTAGTACGG		
GNNGGGNNGGGNNG3'		11

Para amplificar el componente de la cadena pesada de inmunoglobulina de ratones, la reacción de transcriptasa inversa se lleva cabo en un tubo de PCR de 0,2 ml de pared delgada, que contiene 2,5 pmoles del cebador GSP1 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 7), 4 µg del ARN total aislado de un clon de hibridoma apropiado (por ejemplo, clon 4A5 o clon 4B5), y 12 µl de ddH2O tratado con DEPC. Del mismo modo, para el componente de la cadena ligera de inmunoglobulina de ratones, la reacción de transcriptasa inversa se lleva cabo en un tubo de PCR de 0,2 ml de pared delgada que contiene 2,5 pmoles del cebador GSP1 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 9), 4 µg del ARN total de un clon de hibridoma apropiado (por ejemplo, clon 4A5 o clon 4B5), y 12 µl de ddH2O tratado con DEPC.

Las reacciones se llevan a cabo en un ciclizador térmico programable de PTC-100 (MJ Research Inc., Waltham, MA). La mezcla se incuba a 70°C durante 10 minutos para desnaturalizar el ARN y luego se enfría en hielo húmedo durante 1 minuto. Los

tubos se centrifugan brevemente para recoger la humedad de las tapas de los tubos. Posteriormente, los siguientes componentes se agregan a la reacción: 2,5 µl de 10x solución amortiguadora para PCR (200 mM de Tris-HCl, a pH 8,4; 500 mM de KCl); 2,5 µl de $MgCl_2$ [25 mM]; 1 µl de mezcla dNTP [10 mM]; y 2.5 µl de DTT [0.1 M]. Después de mezclar cada tubo por pipeteado suave, los tubos se colocan en un termociclizador PTC-100 a 42°C, durante 1 minuto, para precalentar la mezcla. Posteriormente, se agrega 1 µl (200 unidades) de transcriptasa inversa SuperScript™ II (Gibco-BRL; número de catálogo 18089-011) a cada tubo, se mezcla suavemente por pipeteado y se incuba durante 45 minutos a 42°C. Las reacciones se ciclizan a 70°C durante 15 minutos para terminar la reacción, y luego se ciclizan a 37°C. Posteriormente se agrega mezcla RNase (1 µl) a cada tubo de reacción, se mezcla suavemente y se incuba a 37°C durante 30 minutos.

El ADNc de primera hebra generado mediante la reacción de transcriptasa inversa se purifica con GlassMAX DNA Isolation Spin Cartridge (Gibco-BRL) según las instrucciones del fabricante. A cada reacción de primera hebra, se agrega solución de enlace NaI en un nivel de 120 µl [6 M]. La solución de ADNc/NaI luego se transfiere a un cartucho roscable GlassMAX y se centrifuga durante 20 segundos a 13.000 x g. Los insertos del cartucho cuidadosamente se extraen y el flujo se desecha de los tubos. Los cartuchos luego se vuelven a colocar en los tubos vacíos y se agregan 0,4 ml de 1x solución amortiguadora de lavado fría (4°C) a cada cartucho. Los tubos se centrifugan a 13.000 x g durante 20 segundos y el flujo continuo se desecha. Este paso de lavado se repite otras tres veces. Los cartuchos GlassMAX luego se lavan 4 veces con 0,4 ml de etanol al 70% frío (4°C). Después de desechar el flujo del lavado final de etanol al 70%, los cartuchos se vuelven a colocar en los tubos y se centrifugan a 13.000 x g durante un minuto adicional para secar completamente los cartuchos. Los insertos del cartucho son luego transferidos a un tubo de recuperación de muestras frescas, donde se agregan rápidamente 50 µl de ddH_2O tratado con DEPC a 65°C (precalentado) a

cada cartucho. Los cartuchos se centrifugan a 13.000 x g durante 30 segundos para eluir el ADNc.

C. Adición de colas con la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT)

Para cada muestra de ADNc de primera hebra, los siguientes componentes se agregan a un tubo de PCR de 0,2 ml de pared delgada: 6,5 µl de ddH_2O tratado con DEPC; 5 µl de 5x solución amortiguadora de adición de colas; 2.5 µl de dCTP (2 mM); y 10 µl de la muestra de ADNc purificada por GlassMAX apropiada. Cada 24 µl de reacción se incuba 2-3 minutos en un termociclizador a 94°C para desnaturalizar el ADN y se enfría en hielo húmedo durante 1 minuto. Los contenidos del tubo se recogen mediante centrifugación breve. Posteriormente, 1µl de desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) se agrega a cada tubo. Los tubos se mezclan mediante pipeteado suave y se incuban durante 10 minutos a 37°C en un cliclizador térmico PTC-100. Después de estos 10 minutos incubación, la TdT se termoinactiva mediante ciclización a 65°C durante 10 minutos. Las reacciones se enfrían en hielo y el ADNc de primera hebra con adición de colas con la enzima TdT se almacena a -20°C.

D. PCR de ADNc de primera hebra con adición de colas con dC

Se realizan amplificaciones de PCR duplicadas (dos reacciones de PCR independientes para cada muestra de ADNc de primera hebra con adición de colas con dC), en un volumen de 50µl que contiene 200 µM de dNTPs; 0,4 µM de cebador de anclaje abreviado (*Abridged Anchor Primer*) RACE 5' (SEQ ID NO: 11), y 0,4 µM de la cadena pesada anidada GSP2 (SEQ ID NO: 8) o de la cadena ligera anidada GSP2 (SEQ ID NO: 10), 10 mM de Tris-HCl (a pH 8.3); 1,5 de mM $MgCl_2$; 50 mM de KCl; 5 µl de ADNc con adición de colas con dC, y 5 unidades de ADN polimerasa Expand™ Hi-Fi (Roche/ Boehringer Mannheim GmbH, Alemania). Las reacciones de PCR se amplifican con el uso de un protocolo de temperatura de recocido "Touch-down/Touch-up" en un termociclizador programable PTC-100 (MJ Research Inc.) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C durante 40 segundos, 5 ciclos a 94°C

160

durante 20 segundos, 61°C - 2°C/ciclo durante 20 segundos, 72°C durante 40 segundos + 1 segundo/ciclo, seguido de 5 ciclos a 94°C durante 25 segundos, 53°C + 1°C/ciclo durante 20 segundos, 72°C durante 46 segundos + 1 segundo/ciclo, seguido de 20 ciclos a 94°C durante 25 segundos, 55°C durante 20 segundos, 72°C durante 51 segundos + 1 segundo/ciclo, y una incubación final de 72°C durante 5 minutos.

E. Clonación usando el kit TOPO TA

Los productos de PCR resultantes se purifican en gel con 1% de gel de agarosa utilizando el sistema de purificación QIAQuick Gel (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA), se clonan (TA) en pCR2.1 utilizando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, San Diego, CA, número de catálogo K4550-40), y se transforman en células *E. coli* TOP10F' (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Los clones con insertos son identificados por el tamizaje azul / blanco según las instrucciones del fabricante, donde los clones blancos se consideran clones positivos. Los cultivos de 3,5 ml de caldo Luria líquido (LB) que contiene 50 µg/ml de ampicilina se inoculan con colonias blancas y se hacen crecer a 37°C de un día para otro (cerca de 16 horas) con agitación a 225 rpm.

Se utiliza el kit QIAGEN Plasmid Miniprep (QIAGEN Inc., número de catálogo 12125) para purificar el ADN de plásmido de los cultivos según las instrucciones del fabricante. El ADN de plásmido se suspende en 34 µl de 1x solución amortiguadora TE (a pH 8) y luego los clones positivos se secuencian según se describió anteriormente mediante la secuenciación nucleótida con el método dideoxi fluorescente y la detección automática utilizando reactivos ABI Big Dye Terminator 3.1 en diluciones de 1:4-1:8, y se analiza con el empleo de un secuenciador de ADN ABI 3100. Los cebadores de secuenciamiento utilizados incluyen T7 (5'GTAATACGACTCACTATAGG3'; SEQ ID NO: 12) y cebadores M13 inversos (5'CAGGAAACAGCTATGACC3'; SEQ ID NO: 13). Los resultados del secuenciamiento confirmarán que los clones corresponden a las secuencias de IgG de ratones.

F. Síntesis génica de novo utilizando PCR de extensión con oligonucleótidos superpuestos

Este método incluye el empleo de cebadores oligonucleótidos superpuestos y PCR usando una polimerasa de ADN de alta fidelidad o una mezcla de polimerasas para sintetizar una región V de inmunoglobulina u otro gen. Comenzando en la mitad de la secuencia de la región V, 40-50 cebadores de base están diseñados de tal manera que la cadena en crecimiento se extiende en 20-30 bases, en cualquiera de las direcciones y los cebadores contiguos se superponen en un mínimo de 20 bases. Cada paso de PCR requiere dos cebadores, uno que se ceba en la hebra antisentido (cebador marcado o de sentido) y uno que se ceba en la hebra de sentido (cebador inverso o antisentido) para crear un producto creciente de PCR bicatenario. Durante el diseño de cebadores, pueden hacerse cambios en la secuencia nucleótida del producto final para crear sitios de restricción enzimática; destruir los sitios de restricción enzimática existentes, agregar ligadores flexibles; cambiar, suprimir o insertar las bases que alteran la secuencia de aminoácidos; optimizar la secuencia general de ADN para mejorar la síntesis del cebador y ajustarse a las reglas de uso de codones para el organismo, según se prevé para su empleo en la expresión del gen sintético.

Los pares de cebador se combinan y se diluyen de tal manera que el primer par tiene una concentración de 5 µM y cada par posterior tiene una concentración 2 veces mayor hasta 80 µM. Un µL de cada una de estas mezclas de cebadores se amplifica en unos 50 µL de reacción de PCR utilizando Platinum PCR SuperMix-High Fidelity (Invitrogen, San Diego, CA, número de catálogo 12532-016). Después de una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C, se realizan 30 ciclos de PCR usando un perfil del ciclado de 94°C durante 20 segundos, 60°C durante 10 segundos y 68°C durante 15 segundos. Los productos de PCR se purifican usando columnas de purificación PCR Qiaquick (Qiagen Inc., número de catálogo 28704) para eliminar el exceso de cebadores y enzimas. Este producto de PCR luego se reamplifica con el

próximo conjunto de pares de cebadores diluidos de igual manera, aplicando las condiciones de PCR exactamente como se describió anteriormente, pero aumentando el tiempo de extensión de cada ciclo a 68°C durante 30 segundos. El producto de PCR resultante nuevamente se purifica a partir de los cebadores y las enzimas como se describió anteriormente, se clona usando el kit TOPO-TA y se secuencia exactamente según se describe en la sección E precedente.

Ejemplo 2

Construcción de productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP)

Se construyó una proteína de enlace multivalente multiespecífica con función efectora que contenía un dominio de enlace 1 en forma de un scFv recombinante monocatenario (murino/ser humano) designado 2H7 (VL-ligador-VH). El scFv 2H7 es un producto inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP) que reconoce específicamente la molécula CD20. El dominio de enlace se basó en una secuencia de anticuerpos CD20 humanos públicamente disponibles, registro de GenBank con el número de acceso M17953 para VH, y M17954 para VL. Los SMIP específicos para CD20 se describen en las publicaciones de patentes estadounidenses de titularidad conjunta números 2003/133939, 2003/0118592 y 2005/0136049, que se incorporan íntegramente a la presente a modo de referencia. El ligador peptídico que separa VL y VH era un ligador de 15 aminoácidos que codifica la secuencia: Asp-Gly_3Ser-$(Gly_4Ser)_2$. El dominio de enlace 1 estaba ubicado en el extremo N terminal de la proteína de enlace multiespecífica, con el extremo C terminal de ese dominio enlazado directamente al extremo N terminal de una subregión constante que contenía una bisagra, los dominios C_{H2} y C_{H3}(en orientación amino-a-carboxi). La subregión constante se derivó de un anticuerpo IgG1, que fue aislado mediante la amplificación por PCR de la IgG1 humana de PBMC humanas. La región de bisagra se modificó por la sustitución de tres residuos Ser en lugar de tres residuos Cys presentes en la versión de tipo salvaje del dominio de

bisagra de la IgG1 humana, codificado por la secuencia de 15 aminoácidos: EPKS**C**DKTHT**C**PP**C**P (SEQ ID NO: 12; los tres residuos Cys reemplazados por los residuos Ser se indican en negrita). En las formas de realización alternativas, la región de la bisagra se modificó en una o más de las cisteínas, para que se generaran las bisagras del tipo SSS y CSC. Además, la prolina final a veces se sustituyó con una serina así como las sustituciones cisteína.

El extremo C terminal del dominio C_{H3} se unió covalentemente a una serie de dominios ligadores alternativos yuxtapuestos entre la subregión constante del extremo C terminal y el extremo amino terminal del dominio de enlace 2. Las proteínas de enlace multivalentes preferidas con función efectora tendrán uno de estos ligadores para espaciar la subregión constante del dominio de enlace 2, aunque el ligador no es un componente esencial de las composiciones de la invención, según las propiedades plegables de BD2. Para algunas moléculas multivalentes específicas, el ligador podría ser importante para la separación de los dominios, mientras que para otros quizá sea menos importante. El ligador se unió al extremo N terminal de scFv (2E12 V_H- ligador-V_L), el cual reconoce específicamente la molécula CD28. El ligador que separa los dominios VH y VL de la parte scFv 2E12 de la molécula de enlace multivalente era un ligador de 20 aminoácidos $(Gly_4Ser)_4$, en lugar del ligador estándar $(Gy_4Ser)_3$, generalmente insertado entre los dominios V de un scFv. Se observó que el ligador más largo mejoró las propiedades de enlace del scFv 2e12 en la orientación de VH VL.

La molécula de enlace multivalente multiespecífica construida dentro de un dominio de enlace 1, que comprende la secuencia de péptido líder 2E12 de los aminoácidos 1-23 de la SEQ ID NO: 171; la región variable de la cadena ligera anti-CD20 humana murina 2H7, que se refleja en la posición 24 de la SEQ ID NO: 171; un ligador Asp-Gly_3-Ser-$(Gly_4Ser)_2$, que empieza en el residuo 130 de la SEQ ID NO: 171, la región variable de la cadena pesada anti-CD20 humana murina 2H7 con una sustitución de aminoácidos leucina por serina (VHL11S) en el residuo 11 del dominio

variable para VH, y que tiene un residuo serina simple en el extremo de la región de la cadena pesada (es decir, VTVS donde una secuencia canónica sería VTVSS) (registro de GenBank con el número de acceso M17953), que se interpone entre los dos dominios de enlace BD1 (2H7) y BD2 (2E12) es una subregión constante de la IgG1 humana, incluso una región de bisagra modificada que comprende una secuencia "CSC" o "SSS", y dominios C_{H2} y C_{H3} de tipo silvestre. Las secuencias nucleótidas y de aminoácidos de la proteína de enlace multivalente con función efectora se establecen en las SEQ ID NOS: 228 y 229 para las formas CSC, respectivamente; y las SEQ ID NOS: 170 y 171 para las formas SSS.

Las líneas celulares que se expresan en forma estable se crearon por transfección mediante electroporación de un plásmido de expresión recombinante, sin cortar o linealizado, en células de ovario de hámster chino (células CHO DG44) seguido de la selección en medio que contenía metotrexato. Los cultivos a granel y los pocillos maestros que producían el nivel más alto de proteína de enlace multivalente se amplificaron al aumentar los niveles del metotrexato, y los cultivos adaptados posteriormente se clonaron al limitar la dilución. Las células CHO transfectadas que producían la proteína de enlace multivalente se cultivaron en biorreactores o bolsas usando medio libre de suero producido por JRH Biosciences (Excell 302, número de catálogo 14324-1000M), suplementado con 4 mM de glutamina (Invitrogen, 25030-081), piruvato de sodio (Invitrogen 11360-070, diluido en 1X), aminoácidos no esenciales (Invitrogen, 11140-050, dilución final en 1X), 100 UI/ml de penicilina-estreptomicina (Invitrogen, 15140-122) e insulina (Recombulin) en un nivel de 1μg/ml (Invitrogen, 97-503311). Para la producción se pueden utilizar otros medios basales CHO libres de suero, tal como CD-CHO y similares.

La proteína de fusión se purificó de los sobrenadantes agotados de cultivo de CHO por cromatografía de afinidad con el empleo de proteína A. La proteína de enlace multivalente se purificó con el empleo de una serie de pasos de cromatografía y

filtración que incluyen un filtro de reducción de virus. Los sobrenadantes del cultivo celular se filtraron, luego se sometieron a cromatografía usando proteína A Sepharose en una columna XK 16/40 de GE Healthcare. Después del enlace de la proteína a la columna, ésta se lavó en dPBS, luego se agregaron 1,0 M de NaCl; 20 mM de fosfato de sodio a pH 6; y luego 25 mM de NaCl; 25 mN de NaOAc a pH 5 para extraer las proteínas de enlace no-específicas. La proteína enlazada se eluyó de la columna en 100 mM de glicina (Sigma), a pH 3,5; y se llevó a pH con 0,5 M de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES), a pH 6. Las muestras de proteínas se concentraron a 25 mg/ml en preparación para la purificación por GPC. Se realizó cromatografía por exclusión de tamaño en un equipo AKTA Explorer 100 Air de GE Healthcare, utilizando una columna XK de GE Healthcare y Superdex 200 de grado preparatorio (GE Healthcare).

Posteriormente, el material se concentró y se formuló con 20 mM de fosfato de sodio y 240 mM de sacarosa, con un pH resultante de 6. La composición se filtró antes de llenar con ella viales esterilizados en varias concentraciones, según la cantidad de material recuperado.

Ejemplo 3

Construcción de casete de expresión de escorpión

Un ácido nucleico que contenía 2H7 scFv sintético (anti-CD20; SEQ ID NO: 1) enlazado a una subregión constante, tal como se escribe en el Ejemplo 2, se designó como TRU-015. El ácido nucleico TRU-015, al igual que el scFv 2E12 sintético (anti-CD28 VL-VH; SEQ ID NO: 3) y scFv 2E12 sintético (anti-CD28 VH-VL; SEQ ID NO: 5) que codifican productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños, se utilizaron como plantillas para la amplificación por PCR de los diversos componentes de los casetes de escorpión. La plantilla o andamio para enlazar el dominio de enlace 1 y la subregión constante fue proporcionado por TRU-015 (el ácido nucleico que codifica scFv 2H7 (anti-CD20) enlazado a la subregión constante), y esta plantilla se construyó en el

vector de expresión pD18. Los ácidos nucleicos citados previamente que contenían scFv 2E12 en cualquiera de las dos orientaciones (V_L-V_H y V_H-V_L) proporcionaron la región codificante para el dominio de enlace 2.

Inserción de la bisagra SSS en el TRU 015 $C_{H2}C_{H3}$ para BD2/Ligador

Se utilizó una versión del 2H7 scFv de la IgG1 sintético que contenía la bisagra SSS para crear un casete de escorpión que sirviese como la plantilla para agregar un sitio EcoRI para reemplazar el codón de detención existente en el sitio XbaI. Esta molécula se amplificó por PCR utilizando el cebador 9 (SEQ ID NO: 23; ver la Tabla 1) y el cebador 87 (SEQ ID NO: 40; ver la Tabla 1), al igual que la mezcla Platinum PCR de alta fidelidad (Invitrogen) El fragmento resultante de 1,5 Kbp se purificó y clonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen), se transformó en cepa TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), y se verificó la secuencia de ADN.

Tabla 1

Nº	Nombre	Secuencia 5'-3'	SEQ ID NO
	Cebadores para PCR		
1	hVK3L-F3H3	GCGATAAAGCTTGCCGCCATGGAA GCACCAGCGCAGCTTCTCTTCC	15
2	hVK3L-F2	ACCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTG CTACTCTGGCTCCCAGATACCACCG	16
3	hVK3L-F1-2H7VL	GGCTCCCAGATACCACCGGTCAAAT TGTTCTCTCCCAGTCTCCAG	17
4	2H7VH-NheF	GCGATAGCTAGCCAGGCTTATCTAC AGCAGTCTGG	18
5	G4S-NheR	GCGATAGCTAGCCCCACCTCCTCCA GATCCACCACCGCCCGAG	19
6	015VH-XhoR	GCGTACTCGAGGAGACGGTGACCG T GGTCCCTGTG	20
7	G1H-C-XHO	GCAGTCTCGAGCGAGCCCAAATCTT G TGACAAAACTC	21
8	G1H-S-XHO	GCAGTCTCGAGCGAGCCCAAATCTT C TGACAAAACTC	22

Nº	Nombre	Secuencia 5'-3'	SEQ ID NO
9	CH3R-EcoR1	GCGTGAGAATTCTTACCCGGAGACAGG GAGAGGCTC	23
10	G1-XBA-R	GCGACGTCTAGAGTCATTTACCCGGAG ACAGG	24
11	G4SLinkR1-S	AATTATGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGT GGTGGATCTGGAGGAGGTGGGAGTGGG	25
12	G4SLinkR1-AS	AATTCCCACTCCCACCTCCTCCAGATCCA CCACCGCCCGAGCCACCGCCACCAT	26
13	2E12VLXbaR	GCGTGTCTAGATTAACGTTTGATTTCCAG CTTGGTG	27
14	2E12VLR1F	GCGATGAATTCTGACATTGTGCTCACCCA ATCTCC	28
15	2E12VHR1F	GCGATGAATTCTCAGGTGCAGCTGAAGGA GTCAG	29

Nº	Nombre	Secuencia 5'-3'	SEQ ID NO
16	2E12VHXbaR	GCGAGTCTAGATTAAGAGGAGACGGTGACTGAGGTTC	30
17	2e12VHdXbaF1	GGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATG	31
18	2e12VHdXbaR1	ATTCCCAGCCACTCCAGACCCTTTCCTG	32
19	IgBsrG1F	GAGAACCACAGGTGTACACCCTG	33
20	IgBsrG1R	GCAGGGTGTACACCTGTGGTTCTCG	34
	Cebadores para secuenciamiento		
82	M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	35
83	M13F	GTAAAACGACGGCCAGTG	36
84	T7	GTAATACGACTCACTATAGG	37
85	pD18F-17	AACTAGAGAACCCACTG	38
86	pD18F-20	GCTAACTAGAGAACCCACTG	

Nº	Nombre	Secuencia 5'-3'	SEQ ID NO
			39
87	pD18F-1	ATACGACTCACTATAGGG	40
88	pD18R-s	GCTCTAGCATTTAGGTGAC	41
89	CH3seqF1	CATGAGGCTCTGCACAAC	42
90	CH3seqF2	CCTCTACAGCAAGCTCAC	43
91	CH3seqR1	GGTTCTTGGTCAGCTCATC	44
92	CH3seqR2	GTGAGCTTGCTGTAGAGG	45

Tabla 1. Cebadores oligonucleótidos utilizados para construir el casete de escorpión CD20-CD28. Los cebadores se separan en dos grupos: para PCR y secuenciamiento. Los cebadores para PCR utilizados para construir el casete y los cebadores para secuenciameinto fueron empleados para confirmar la secuencia de ADN de todas las construcciones intermedias y finales.

Fusión de n2H7 V_K y la secuencia líder V_{K3} humana

La mutagénesis PCR dirigida por oligonucleótidos se utilizó para introducir un sitio de restricción AgeI (ACCGGT) en el extremo 5' de la región codificante para TRU 015 VK y un sitio de restricción Nhe I (GCTAGC) en el extremo 3' de la región codificante para los ligadores (G4S)3 que utilizaban los cebadores 3 y 5 de la Tabla 1. Dado que el cebador

3 también codifica los últimos 6 aminoácidos de la secuencia VK3 líder humana (gb:X01668), se utilizó la PCR superpuesta para agregar en secuencias las secuencias N terminales del líder que incluye un caja de consenso Kozak y el sitio de restricción HinDIII (AAGCTT) utilizando los cebadores 1, 2 y 5 de la Tabla 1.

Construcción de la bisagra SSS de n2H7 IgG1-$C_{H2}C_{H3}$

Los cebadores 4 y 6 (SEQ ID NOS: 18 y 20, respectivamente; Tabla 1); se utilizaron para reamplificar el TRU-015 V_H con un sitio Nhel 5' para fusionarse con V_K para TRU-015 y un sitio Xho I (5'-CTCGAG-3') en la unión del extremo 3' con los dominios bisagra-$C_{H2}C_{H3}$ de la IgG1. Del mismo modo, la región bisagra-$C_{H2}C_{H3}$ de la IgG1 se amplificó utilizando los cebadores 8 y 9 de la Tabla 1, introduciendo un sitio 5' Xho I y reemplazando el extremo 3' existente con un sitio EcoRI (5'-GAATTC-3') para clonación, y destruyendo el codón de detención para permitir la traducción del dominio de enlace 2 unido aguas abajo del dominio CH3. Esta versión del casete de escorpión se distingue del casete descrito previamente por el prefijo "n".

Además de la proteína de enlace multivalente que se describió, una proteína según la invención puede tener un dominio de enlace, ya sea dominio de enlace 1 ó 2, o ambos, que corresponde a una región variable simple de una inmunoglobulina. Las formas de realización de este aspecto de la invención incluirían dominios de enlace correspondientes al dominio V_H de un anticuerpo de camélido, o una región V simple modificada o no-modificada de anticuerpos de otras especies capaces de enlazarse al antígeno diana, si bien cualquier dominio variable simple se contempla como útil en las proteínas de la invención.

Construcciones 2E12 VL-VH y VH-VL

A fin de hacer que los 2E12 scFvs sean compatibles con el casete, es preciso destruir un sitio Xba I (5'-TCTAGA-3') interno usando los cebadores oligonucleótidos superpuestos 17 y 18 de la Tabla 1. Estos dos cebadores en combinación con los pares de cebadores 14/16 (VL-VH) ó 13/15 (VH-VL) se utilizaron para amplificar los dos

dominios de enlace orientados en sentido opuesto, de manera tal que ambos transportan sitios EcoRI y XbaI en sus extremos 5' y 3', respectivamente. Los cebadores 13 y 16 también codifican un codón de detención (TAA) inmediatamente frente al sitio XbaI.

Construcción 2H7 SSS IgG1 2e12 LH/HL

Agregado de ligador de dominio efector-dominio ligador 2 (Ligadores STD-STD1 y STD2)

Los cebadores complementarios 11 y 12 de la Tabla 1 se combinaron, se calentaron a 70°C y se enfriaron lentamente hasta la temperatura ambiente para permitir el recocido de las dos hebras. Se agregaron grupos fosfato 5' usando quinasa polinucleótida T4 (Roche) en solución amortiguadora ligadora 1X con 1 mM de ATP (Roche) usando el protocolo del fabricante. El ligador bicatenario resultante luego se ligó en el sitio EcoRI entre las regiones codificantes para el extremo terminal C_{H3} de la IgG1 y el inicio del dominio de enlace 2 utilizando ligasa de ADN del fago T4 (Roche). Las construcciones de ADN resultante se tamizaron para definir la presencia de un sitio EcoRI en la unión ligador-BD2 y la secuencia nucleótida GAATTA en la unión C_{H3}-ligador. La correcta construcción STD1-ligador luego se redigirió con EcoRI y se repitió la ligadura del ligador para producir una molécula que tenía un ligador compuesto de dos interacciones idénticas (STD 2) de la secuencia Lx1. Las construcciones de ADN volvieron a tamizarse, según se explicó.

Ejemplo 4

Estudios de expresión

Los estudios expresión se realizaron en los ácidos nucleicos descriptos anteriormente que codifican las proteínas de enlace multivalentes con función efectora. Los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de enlace multivalentes se transfectaron transitoriamente en células COS, y las células transfectadas se

mantuvieron en condiciones bien conocidas que permitieran la expresión de genes heterólogos en estas células. El ADN se transfectó transitoriamente en células COS utilizando PEI ó DEAE-dextrano como se describió previamente (PEI = Boussif O. y colaboradores, *PNAS* 92: 7297-7301, (1995), que se incorpora a la presente a modo de referencia; Pollard H. y colaboradores, *JBC* 273: 7507-7511, (1998) que se incorpora íntegramente a la presente a modo de referencia). Las transfecciones independientes múltiples de cada molécula nueva se realizaron para determinar el nivel expresión promedio para cada nueva forma. Para la transfección por PEI, las células COS se colocaron sobre las placas de cultivo tisular de 60 mm en DMEM/10% de medio FBS y se incubaron toda la noche, de modo que tuvieran una confluencia de aproximadamente 90% el día de la transfección. El medio se cambió al suero DMEM libre que no contenía ningún antibiótico y se incubó durante 4 horas. El medio de transfección (4 ml/placa) contenía DMEM libre de suero con 50 µg de PEI y 10-20 ug de plásmido de ADN de interés. El medio de transfección se mezcló con agitación excéntrica, se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se agregó a las placas después de aspirar el medio existente. Los cultivos se incubaron durante 3-7 días antes de la recolección de los sobrenadantes. Los sobrenadantes del cultivo se sometieron a ensayo para determinar la expresión de proteínas mediante SDS-PAGE, transferencia Western (Western blotting), el enlace se verificó por citometría de flujo y la función se sometió a ensayo con el empleo de una variedad de ensayos, incluso ADCC, CDC y experimentos de cultivos concurrentes.

Análisis por SDS.PAGE y transferencia Western (Western blotting)

Se prepararon muestras de los sobrenadantes de cultivo en crudo (generalmente 30 µl/pocillo) o alícuotas de proteínas purificadas, con un contenido de 8 ug de proteína por pocillo, y se agregó solución amortiguadora 2X Tris-Glicina SDS (Invitrogen) a una concentración final de 1X. Se hizo una corrida con diez (10) µl de marcador SeeBlue Marker (Invitrogen, Carlsbad, CA) para proporcionar estándares de

tamaño MW. Las variantes de las proteínas de enlace (de fusión) multivalentes se sometieron a análisis SDS-PAGE en 4 a 20% de geles de Tris-glicina Novex (Invitrogen, San Diego, CA). Las muestras se cargaron usando un amortiguador para muestras SDS de Tris-glicina Novex (2X) en condiciones reductoras o no reductoras, después del calentamiento a 95°C durante 3 minutos, seguido de electroforesis a 175V durante 60 minutos. La electroforesis se realizó utilizando 1X de solución amortiguadora de corrida de Tris-glicina SDS Novex .

Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a las membranas de PVDF usando un aparato electroblotter semiseco (Ellard, Seattle, WA) durante 1 hora a 100 mAmp. Las soluciones amortiguadores para transferencia Western incluyeron las siguientes tres soluciones amortiguadoras presentes en papel filtrante Whatman, y se apilaron de manera sucesiva: N°1: contenía 36,34 g/litro de Tris, a pH 10,4; y 20% de metanol; N° 2 contenía 3,02 g/litro de Tris, a pH 10,4; y 20% de metanol; y N° 3 contenía 3,03 g/litro de Tris, a pH 9,4; 5,25 g/litro de ácido ε-amino caproico y 20% de metanol. Las membranas se bloquearon en BLOTTO = 5% de leche descremada en PBS durante toda la noche con agitación. Las membranas se incubaron con anti-IgG humana de caprinos conjugada con HRP (Fc específico, Caltag) en un nivel de 5 ug/ml en BLOTTO durante una hora, luego se lavaron 3 veces durante 15 minutos cada vez en PBS-0,5% Tween 20. Las membranas húmedas se incubaron con solución de ECL durante 1 minuto, seguida de la exposición a la película X-omat durante 20 segundos. La Figura 2 muestra un análisis por transferencia Western de proteínas expresadas en sobrenadante de cultivo celular COS (30 µl/pocillo) sometido a electroforesis en condiciones no-reductoras. Los carriles se indican con los marcadores 1 a 9, y contienen las siguientes muestras: Carril 1 (corte): ver marcadores azules, kDa se indican al costado de la mancha. Carril 2: 2H7-sssIgG P238S/P331S-STD1-2e12 VLVH; carril 3: 2H7-sssIgG P238S/P331S-STD1-2e12 VHVL, Carril 4: 2H7-sssIgG P238S/P331S-STD2-2e12 VLVH; Carril 5: 2H7-sssIgG P238S/P331S-STD2-2e12

VHVL; Carril 6: 2e12 VLVH SMIP; Carril 7: 2e12 VHVL SMIP; Carril 8: 2H7 SMIP. 2H7 en estas construcciones está siempre en orientación VLVH, sssIgG indica la identidad de la bisagra/ligador ubicado en la posición del ligador 1 como se muestra en la Figura 5, P238S/P331S indica la versión de la IgG1 humana con mutaciones del tipo salvaje (enumerada primera aa) a mutante (enumerada segunda aa) y la posición del aminoácido en la cual se producen en los dominios C_{H2} y C_{H3} de la IgG1 humana del tipo silvestre, STD1 indica el ligador de 20 aminoácidos (18 + sitio de restricción) ubicado en una posición de ligador 2, como se muestra en la Figura 5; y STD2 indica el ligador de 38 aminoácidos (36+ sitio de restricción) ubicado en la posición del ligador 2 como se muestra en la Figura 6.

Estudios de enlace

Los estudios de enlace se realizaron para evaluar las propiedades de enlace biespecíficas de los péptidos de enlace multivalentes, multiespecíficos CD20/CD28. Inicialmente, las células WIL2-S se agregaron a placas de 96 pocillos y se centrifugaron para peletear las células. A las placas sembradas, se agregó la proteína purificada CD20/CD28, usando las titulaciones dobles a través de la placa de 20 µg/ml hasta 0,16 µg/ml. Una serie de dilución doble de proteína purificada TRU-015 (fuente del dominio de enlace 1) también se agregó a los pocillos de las placas sembradas, la concentración de TRU-015 se extendió de 20 µg/ml a 0,16 µg/ml. Un pocillo que no contenía ninguna proteína se utilizó como el control.

Las placas sembradas que contenían las proteínas se incubaron en el hielo durante una hora. Posteriormente, los pocillos se lavaron una vez con 200 µl de FBS al 1% en PBS. El anticuerpo anti-humano de caprinos marcado con FITC (Fc Sp) en una proporción de 1:100 luego se agregó a cada pocillo, y las placas nuevamente se incubaron en hielo durante una hora. Las placas inmediatamente se lavaron una vez con 200 µl de FBS al 1% en PBS, las células se resuspendieron en 200 µl de FBS al 1% y se analizaron por FACS.

Para evaluar las propiedades de enlace del péptido anti-CD28 2E12 V_HV_L, las células de CHO que expresaban CD28 se sembraron en los pocillos individuales de una placa de cultivo. La proteína purificada CD20/CD28 luego se agregó a los pocillos individuales empleando un esquema de dilución doble, que se extendía de 20 µg/ml a 0,16 µg/ml. La proteína purificada 2E12IgG-VHVL SMIP luego se agregó a los pocillos sembrados individuales empleando un esquema de dilución doble, es decir, de 20 µg/ml a 0,16 µg/ml. Un pocillo que no recibió ninguna proteína se utilizó como el control. Las placas luego se incubaron en el hielo durante una hora, se lavaron una vez con 200 µl de FBS al 1% en PBS, y a cada pocillo se agregó anticuerpo antihumano de caprinos marcado con FITC (Fc Sp, CalTag, Burlingame, CA) en una proporción de 1:100. Las placas nuevamente se incubaron en el hielo durante una hora y posteriormente se lavaron una vez con 200 µl FBS al 1% en PBS. Después de la resuspensión de las células en 200 µl de FBS al 1%, se realizó el análisis por FACS. Los resultados manifestaron que las proteínas de enlace multivalentes con el dominio de enlace a CD20 1 en el extremo N terminal se enlazaban a CD20; aquellas proteínas que tenían el dominio de enlace a CD28 2 en el extremo C terminal en la orientación N-V_H-V_L-C también se enlazaron a CD28.

Se evidenció que las proteínas expresadas se enlazaban a CD20 presentada en las células 2S-WIL (ver Figura 3) y a CD28 presentada en células CHO (remitirse a la Figura 3) por citometría de flujo (FACS), de ese modo demostrando que BD1 o BD2 podría funcionar para enlazarse al antígeno diana específico. Cada conjunto de datos sobre los gráficos en la figura 3 muestra la unión de las diluciones seriadas de las diferentes proteínas de enlace (de fusión) multivalentes sobre los rangos de titulación indicados. Los datos obtenidos usando estas construcciones iniciales indican que las proteínas de enlace (de fusión) multivalentes con el dominio de enlace 2 usando 2e12 en la orientación de VHVL expresan mejor y se enlazan mejor a CD28 que la forma en la orientación de VLVH en concentraciones equivalentes.

La Figura 4 muestra una representación gráfica de los resultados de los estudios de enlace realizados con proteínas purificadas de cada una de estas transfecciones/construcciones. La figura muestra los perfiles de enlace de las proteínas a CD20 que expresan las células 2S-WIL, demostrando que la molécula multivalente se une a CD20, así como el SMIP monoespecífico en la misma concentración. Los paneles superior e inferior de la Figura 5 muestran los perfiles de enlace de la especificidad de BD2 (2e12=CD28) a las células CD28 CHO. Para enlazar el dominio de enlace 2 a CD28, la orientación de las regiones V afectó el enlace de 2e12. Las proteínas de enlace multivalentes 2H7-sss-hIgG-STD1-2e12 con el 2e12 en la orientación VH-VL (HL) mostró enlace en un nivel equivalente al SMIP monoespecífico, mientras que la molécula 2e12 LH muestra un enlace menos eficaz en la misma concentración.

Ejemplo 5

Construcción de varias formas de ligadores de las proteínas de fusión multivalentes

Este ejemplo describe la construcción de las diferentes formas de ligadores que se enumeran en la Figura 6.

Construcción de ligadores C_{H3}-BD2 H1 a H7

Para explorar el efecto de la longitud y la composición del ligador CH3-BD2 sobre la expresión y el enlace de las moléculas de escorpión, se diseñó un experimento para comparar la molécula existente 2H7sssIgG1-Lx1-2e12HL con un conjunto más grande de construcciones similares con diferentes ligadores. Usando 2H7sssIgG1-Lx1-2e12HL como plantilla, se realizó una serie de reacciones de PCR usando los cebadores enumerados en la Tabla 2 de oligonucleóticos, cuyos ligadores creados tuvieron una longitud variable de entre 0 y 16 aminoácidos. Estos ligadores se construyeron como fragmentos de ácidos nucleicos que abarcaban la región codificante para C_{H3} en el sitio

BsrGI hasta el final del ácido nucleico que codificaba la unión de ligador-BD2 en el sitio EcoRI.

Tabla 2

Nº	Nombre	Secuencia 5'-3'	SEQ ID NO
	Cebadores para PCR		
1	L1-11R	GCGATAGAATTCCCAGATCCACCACCGCCCGA GCCACCGCCACCATAATTC	46
2	L1-6R	GCGATAGAATTCCCAGAGCCACCGCCACCATA ATTC	47
3	L3R	GCGTATGAATTCCCCGAGCCACCGCCACCCTTA CCCGGAGACAGG	48
4	L4R	GCGTATGAATTCCCAGATCCACCACCGCCCGAG CCACCGCCACCCTTAC	49
5	L5R	GCGTATGAATTCCCGCTGCCTCCTCCCCCAGATC CACCACCGCC	50
6	IgBsrG1F	GAGAACCACAGGTGTACACCCTG	51

7	L-CPPCPR	GCGATAGAATTCGGACAAGGTGGACACCCC TTAC CCGGAGACAGGGAGAG	52

Tabla 2. Secuencias de cebadores utilizadas para generar variantes de ligadores CH3-BD2.

La Figura 6 diagrama la estructura esquemática de una proteína de enlace (de fusión) multivalente, y muestra la orientación de las regiones V para cada dominio de enlace, la secuencia presente en la posición del ligador 1 (sólo se enumeran los residuos Cys), y la secuencia y el identificador para el o los ligadores ubicados en la posición del ligador 2 de las moléculas.

Ejemplo 6

Estudios de enlace y funcionales con formas variantes del ligador de las proteínas de fusión multivalentes 2H7-IgG-2e12 prototipo.

Este ejemplo muestra los resultados de una serie de estudios de expresión y de enlace sobre la construcción "prototipo" 2H7-sssIgG-Hx-2e12 VHVL con diversos ligadores (H1-H7) presentes en la posición del ligador 2. Cada una de estas proteínas fue expresada por la transfección transitoria de células COS a gran escala y la purificación de las moléculas se realizó usando cromatografía de afinidad con proteína A, según se describió en los ejemplos anteriores. Las proteínas purificadas luego se sometieron a análisis utilizando SDS-PAGE, transferencia Western (Western blotting), estudios de enlace analizados por citometría de flujo y ensayos funcionales para determinar la actividad biológica.

Estudios de enlace para comparar las diferentes orientaciones de BD2

Los estudios de enlace se realizaron según se describe en los ejemplos anteriores, excepto que se utilizó material purificado por proteína A, y una cantidad

constante de proteína de enlace (de fusión) se usó para cada variante estudiada, es decir, 0,72 ug/ml. La Figura 7 muestra un gráfico de columnas que compara las propiedades de enlace de cada variante ligadora y la variante de orientación 2e12, tanto a células diana CD20 como CD28. H1-H6 se refiere a las construcciones con los ligadores H1-H6 y 2e12 en la orientación VH-VL. L1-L6 se refiere a las construcciones con los ligadores H1-H6 y 2e12 en la orientación VL-VH. Los datos demuestran que la especificidad del dominio de enlace 2 para 2e12 enlaza mucho más eficientemente cuando está presente en la orientación HL (muestras H1-H6) que cuando está en la orientación LH (muestras L1-L6). El efecto de la longitud del ligador se complica mediante el descubrimiento, según se manifiesta en el próximo conjunto de figuras, de que las moléculas con los ligadores más largos contienen algunas moléculas clivadas monoespecificas que carecen de la especificidad de enlace a CD28 en el extremo terminal carboxi. Se realizaron otros experimentos dirigidos al enlace de los ligadores seleccionados, cuyos los resultados se muestran en las Figuras 10, 12 y 13.

Análisis por SDS-PAGE de variantes de ligadores H1-H7

Se prepararon muestras a partir de alícuotas de proteínas purificadas, que contenían 8 µg de proteína por pocillo, y se agregaron 2X de solución amortiguadora Tris-glicina en una concentración final de 1X. Para las muestras reducidas/geles, se agregó solución amortiguadora 10X a muestras 1X más solución amortiguadora Tris-glicina SDS. Se hizo una corrida con diez (10) µl de marcador de peso molecular SeeBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) para proporcionar estándares de tamaño MW. Las variantes de las proteínas de enlace (de fusión) multivalentes se sometieron a análisis SDS-PAGE en 4 a 20% de geles de Tris-glicina Novex (Invitrogen, San Diego, CA). Las muestras se cargaron usando un amortiguador para muestras SDS de Tris-glicina Novex (2X) en condiciones reductoras o no reductoras, después del calentamiento a 95°C durante 3 minutos, seguido de electroforesis a 175V durante 60 minutos. La electroforesis se realizó utilizando 1X de solución amortiguadora de corrida en Tris-

glicina SDS Novex. Los geles se tiñeron después de la electroforesis en azul de Coomassie SDS PAGE R-250 durante 30 minutos con agitación, y se destiñeron durante una hora, como mínimo. La Figura 8 muestra geles teñidos Coomassie reducidos y no-reducidos de las variantes de proteínas de enlace (de fusión) multivalente [2H7-sss-hIgG P238S/P331S-Hx-2e12 VHVL], junto con TRU-015 y HLSMIP 2e12 como muestras de control. A medida que aumenta la longitud del ligador, se incrementa la cantidad de proteína que corre a aproximadamente el tamaño del SMIP (o 52 kDa). El aumento de la cantidad de proteína en esta banda corresponde a una disminución en la cantidad de proteína en la banda superior que corre a alrededor de 90 kDa. Los datos del gel indican que la molécula de longitud completa se cliva en o cerca del ligador, para generar una molécula que carece de la región BD2. Un fragmento BD2 más pequeño no está presente, lo cual indica (1) que la secuencia nucleótida dentro de la secuencia del ligador puede estar creando un sitio de empalme críptico que elimina el fragmento más pequeño de la transcripción de ARN empalmado, o (2) que la proteína está proteolíticamente clivada después de la traducción del polipéptido de longitud completa, y que el fragmento BD2 más pequeño es inestable, es decir, susceptible al procesamiento proteolítico. El análisis por transferencia Western de algunas de estas moléculas indica que todas las proteínas contienen la secuencia CD20 BD1, pero una banda más pequeña carece de reactividad CD28 BD2. No se observó ninguna banda más pequeña que migrase en el tamaño de scFv "básico" (25-27 kDa) en ninguno de los geles o manchas, lo cual indica que este fragmento peptídico más pequeño no se encuentra en las muestras.

Análisis de transferencia Western de BD1 y BD2 mediante Fab específico de 2H7 ó CD28mIg

La Figura 9 muestra los resultados de análisis de transferencia Western de las proteínas de enlace (de fusión) multivalentes 2H7-sss-hIgG-H6 en comparación con cada SMIP monoespecífico.

La electroforesis se realizó en condiciones no-reductoras, y sin muestras en ebullición antes de cargar. Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a las membranas de PVDF usando un aparato electroblotter semiseco (Ellard, Seattle, WA) durante 1 hora a 100 mAmp. Las membranas de bloquearon en BLOTTO (5% de leche descremada en PBS) durante toda la noche con agitación. Figura 9A: Las membranas se incubaron con AbyD02429.2, un Fab dirigido al anticuerpo 2H7, en un nivel de 5 μg/ml en BLOTTO durante una hora, luego se lavaron 3 veces durante 5 minutos cada vez, en PBS-0,5% de Tween 20. Las membranas luego se incubaron en 6X His-HRP durante una hora en una concentración de 0,5 μg/ml. Las transferencias se lavaron tres veces durante 15 minutos cada vez en PBST. Las membranas húmedas se incubaron con solución de ECL durante 1 minuto, seguida de la exposición a la película X-omat durante 20 segundos.

Figura 9B: Las membranas se incubaron con CD28Ig (Ancell, Bayport, MN) en un nivel de 10 μg/ml en BLOTTO, luego lavaron tres veces durante 15 minutos cada vez en PBS-0,5% de Tween 20. Las membranas luego se incubaron en el conjugado HRP anti-ratón de caprinos (CalTag, Burlingame, CA) en un nivel de 1:3000 en BLOTTO. Las membranas se lavaron tres veces, durante 15 minutos cada vez, luego se incubaron en la solución de ECL durante 1 minuto, seguido de la exposición a la película X-omat durante 20 segundos. Los resultados de las transferencias Western indicaron que el dominio de enlace CD28 estaba presente en la fracción de "monómero" multivalente, migrando a aproximadamente 90 kDa y en formas superiores. Ninguna banda fue detectable migrando en la posición esperada para un único SMIP o fragmento del tamaño scFv básico. Cuando se utilizó un Fab anti-idiotipo CD20, se detectó un fragmento de tamaño del SMIP, lo que indica la presencia de un fragmento de péptido que contenía (2H7-sss-hIgG), que carecía de la porción CD28 scFv BD2 de la proteína de fusión.

Estudios de enlace sobre los ligadores seleccionados

La Figura 10 muestra los resultados de los estudios de enlace realizados sobre proteínas de fusión 2H7-sss-hIgG-Hx-2e12 purificadas. Los estudios de enlace se realizaron para evaluar las propiedades de enlace biespecíficas de los péptidos de enlace multiespecíficos CD20/CD28. Inicialmente, se colocaron células WIL2-S en placas de cultivo utilizando técnicas convencionales. A las placas sembradas, se agregó la proteína purificada CD20/CD28, usando las titulaciones dobles a través de la placa de 20 µg/ml hasta 0,16 µg/ml. Una serie de dilución doble de proteína purificada TRU-015 (fuente del dominio de enlace 1) también se agregó a los pocillos de las placas sembradas, la concentración de TRU-015 se extendió de 20 µg/ml a 0,16 µg/ml. Un pocillo que no contenía ninguna proteína se utilizó como el control.

Las placas sembradas que contenían las proteínas se incubaron en el hielo durante una hora. Posteriormente, los pocillos se lavaron una vez con 200 µl de FBS al 1% en PBS. El anticuerpo anti-humano de caprinos marcado con FITC (Fc Sp) en una proporción de 1:100 luego se agregó a cada pocillo, y las placas nuevamente se incubaron en hielo durante una hora. Las placas inmediatamente se lavaron una vez con 200 µl de FBS al 1% en PBS, las células se resuspendieron en 200 µl de FBS al 1% y se analizaron por FACS.

Para evaluar las propiedades de enlace del péptido anti-CD28 2E12 V_HV_L, las células de CHO que expresaban CD28 se sembraron en los pocillos individuales de una placa de cultivo. La proteína purificada CD20/CD28 luego se agregó a los pocillos individuales empleando un esquema de dilución doble, que se extendía de 20 µg/ml a 0,16 µg/ml. La proteína purificada 2E12IgGvHvL SMIP luego se agregó a los pocillos sembrados individuales, nuevamente empleando un esquema de dilución doble, es decir, de 20 µg/ml a 0,16 µg/ml. Un pocillo que no recibió ninguna proteína se utilizó como el control. Las placas luego se incubaron en el hielo durante una hora, se lavaron una vez con 200 µl de FBS al 1% en PBS y a cada pocillo se agregó anticuerpo

antihumano de caprinos marcado con FITC (Fc Sp) en una proporción de 1:100. Las placas nuevamente se incubaron en el hielo durante una hora y posteriormente se lavaron una vez con 200 µl de FBS al 1% en PBS. Después de la resuspensión de las células en 200 µl de FBS al 1%, se realizó el análisis por FACS. Se evidenció que las proteínas expresadas se enlazaban a la molécula CD20 presente en las células 2S-WIL (ver Figura 10A) y a la molécula CD28 presente en células CHO (remitirse a la Figura 10B) por citometría de flujo (FACS), de ese modo demostrando que BD1 o BD2 podría funcionar para enlazar el antígeno diana específico. Además, no se encontró que el ligador usado (H1-H6) afectase significativamente la avidez de enlace a un antígeno diana.

Fraccionamiento por SEC de proteínas de enlace (de fusión) multivalentes. La proteína de enlace (de fusión) se purificó a partir de los sobrenadantes del cultivo celular por cromatografía de afinidad en proteína A Sepharose sobre una columna XK 16/40 GE Healthcare. Después del enlace de la proteína a la columna, ésta se lavo en dPBS, luego se agregaron 1,0 M de NaCl; 20 mM de fosfato de sodio a pH 6; y posteriormente 25 mM de NaCl; 25 mN de NaOAc a pH 5 para extraer las proteínas de enlace no-específicas. La proteína enlazada se eluyó de la columna en 100 mM de glicina (Sigma), a pH 3,5; y se llevó a pH con 0,5 M de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES), a pH 6. Las muestras de proteínas se concentraron a 25 mg/ml, con el empleo de técnicas convencionales, en preparación para la purificación por GPC. Se realizó cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) en un aparato AKTA Explorer 100 Air de GE Healthcare, utilizando una columna XK de GE Healthcare y Superdex 200 de grado preparatorio (GE Healthcare).

La Figura 12 muestra una tabla que resume los resultados del fraccionamiento por SEC de las diferentes proteínas de enlace (de fusión). Con el aumento de la longitud del ligador, también se incrementa la complejidad de las moléculas en solución, dificultando el aislamiento de los picos de interés, o POI de formas de órdenes

superiores por HPLC. El ligador H7 parece resolver gran parte de esta complejidad en una forma más homogénea en la solución, de manera que las formas solubles migren principalmente como un único POI a aproximadamente 172 kDa.

Otros estudios de enlace

Una segunda serie de experimentos se realizó (ver Figuras 12 y 13) con un subconjunto más pequeño de proteínas de enlace (de fusión) multivalentes, esta vez comparando los ligadores H3, H6 y H7. Los datos demuestran que el nivel de enlace desciende más significativamente para el enlace a CD28 que a CD20, pero ambos decaen levemente a medida que aumenta la longitud del ligador. Aún más, los datos mostraron que el ligador H7 presentó el nivel más alto de enlace a ambos antígenos. Estos datos se obtuvieron usando la proteína de enlace (de fusión) multivalente purificada por proteína A, pero no fueron purificadas en mayor grado por SEC, con lo cual las formas múltiples de las moléculas pueden haber estado presentes en la solución. Los resultados también indicaron que la forma truncada puede haber sido menos estable que el polipéptido multivalente verdadero, ya que las curvas de enlace no parecen reflejar plenamente la cantidad significativa de la forma monoespecífica presente en la solución para el ligador H6.

Demostración de enlace multiespecífico de una molécula simple

Se realizó un análisis de enlace alternativo (ver Figura 13), donde el enlace a CD20 en la superficie de las células 2S-WIL se detectó con un reactivo específico para el CD28 BD2, de ese modo demostrando que puede existir enlace simultáneo a ambos antígenos diana, que se unen tanto al BD1 como al BD2 en la misma proteína de enlace (de fusión) multiespecífica (remitirse a la figura 12). Este ensayo demuestra la propiedad de enlace multiespecífico de las proteínas.

Ejemplo 7

Construcción de proteínas de enlace (de fusión) multiespecíficas con especificidades alternativas en BD2.

Además de la molécula de enlace multiespecífica CD20-CD28 prototipo, otras dos formas se hicieron con regiones de dominio de enlace 2 alternativas, incluidos los dominios de enlace CD37 y CD3. Las moléculas también se hicieron con varios de los dominios ligadores descriptos para las proteínas de enlace (de fusión) multiespecíficas [2H7-sss-IgG-Hx/STDx-2e12 HL]. A continuación se describe la construcción de estas moléculas de enlace (de fusión) multiespecíficas adicionales.

Construcción del dominio de enlace anti-CD37

Tabla 3

Nº	**Nombre**	**Secuencia**	**SEQ ID NO**
23	G281LH-NheR	ACTGCTGCAGCTGGACCGCGCT AGCTCCGCCGCCACCCGAC	53
24	G281LH-NheF	GGCGGAGCTAGCGCGGTCCAG C TGCAGCAGTCTGGACCTG	54
25	G281-LH-LPinF	GCGATCACCGGTGACATCCAGA T GACTCAGTCTCCAG	55
26	G281-LH-HXhoR	GCGATACTCGAGGAGACGGTGA C TGAGGTTCCTTGAC	56
27	G281-LH-LEcoF	GCGATCGAATTCAGACATCCAG AT GACTCAGTCTCCAG	57

Nº	Nombre	Secuencia	SEQ ID NO
28	G281-LH-HXbaR	GCGATTCTAGATTAGGAAGAGACG GTGACTGAGGTTCCTTGAC	58
29	G281-HL-HF	GCGATAACCGGTGCGGTCCAGCTG CAGCAGTCTGGAC	59
30	G281-HL-HR3	GACCCACCACCGCCCGAGCCACCG CCACCAGAAGAGACGGTGACTGAGG TTC	60
31	G281-HL-HR2	ACTCCCGCCTCCTCCTGATCCGCCG CCACCCGACCCACCACCGCCCGAG	61
32	G281-HL-HNheR	GAGTCATCTGGATGTCGCTAGCACTC CCGCCTCCTCCTGATC	62
33	G281-HL-LNheF	ATCAGGAGGAGGCGGGAGTGCTAGC GACATCCAGATGACTCAGTC	63
34	G281-HL-LXhoR	GCGATACTCGAGCCTTTGATCTCCAG TTCGGTGCCTC	64
35	G281-HL-LXbaR	GCGATATCTAGACTCAACCTTTGATCT	65

Nº	Nombre	Secuencia	SEQ ID NO
		CCAGTTCGGTGCCTC	
36	G281-HL-EcoF	GCGATAGAATTCGCGGTCCAGC TGCA GCAGTCTGGAC	66

Tabla 3. Cebadores oligonucleótidos utilizados para generar dominios de enlace G28-1 anti-CD37, tanto para moléculas de SMIP como para escorpiones.

El G28-1 scFv (SEQ ID NO: 102) se convirtió al G28-1 LH SMIP mediante PCR utilizando los cebadores indicados en la Tabla X precedente. Combinando los cebadores 23 y 25 con 10 ng de G28-1 scFv, se amplificó VK durante 30 ciclos a 94°C durante 20 segundos; 58°C durante 15 segundos; 68°C durante 15 segundos con el empleo de mezcla Platinum PCR Supermix Hi-Fidelity PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un termociclizador ABI 9700. El producto de esta PCR tenía sitios de restricción PinAI (AgeI) en el extremo 5' de VK y NheI en el extremo del ligador scFv (G4S)3. La VH se alteró, igualmente, combinando los cebadores 24 y 26 con 10 ng de G28-1 scFv en una PCR corrida bajo condiciones idénticas que con la VK precedente. Este producto de PCR tenía los sitios de restricción NheI en el extremo 5' de la VH y XhoI en el extremo 3'. Debido a la significativa identidad de secuencia se diseñó la superposición con técnicas de ingeniería genética en los cebadores 23 y 24, las VK y VH se diluyeron cinco veces, luego se agregaron en una relación 1:1 a una PCR, utilizando los cebadores flanqueadores 25 y 26 y un scFv de longitud completa se amplificó, como se indicó, alargando el tiempo a 68°C de 15 segundos a 45 segundos. Este producto de PCR representó el G28-1 scFv entero como un fragmento PinAI-XhoI y se purificó mediante purificación en columna con un equipo MinElute (Qiagen), para eliminar el exceso de cebadores, enzimas y sales. El eluato se digirió hasta la

completitud con PinAI (Invitrogen) y XhoI (Roche) en solución amortiguadora H (Roche) 1X, a 37°C durante 4 horas en un volumen de 50 µL. El producto de PCR digerido luego se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%, el fragmento se eliminó del gel y se repurificó en una columna MinElute utilizando solución amortiguadora QG y se incubó la mezcla de gel-solución amortiguadora a 50°C durante 10 minutos, con mezclado intermitente para disolver la agarosa después de lo cual la purificación en la columna fue idéntica para la eliminación del cebador después de la PCR. 3 µL de G28-1 LH digerido con PinAI-XhoI se combinó con 1 µL de pD18-n2H7sssIgG1 SMIP digerido con PinAI-XhoI en una reacción de 10 µL con solución amortiguadora ligadora LigaFast [5 µL 2X] (Promega, Madison, WI) y 1 µL de ligasa de ADN del fago T4 DNA (Roche), bien mezclado e incubado a temperatura ambiente durante 10 minutos. 3 µL de esta ligación se transformó en TOP 10 competente (Invitrogen) utilizando el protocolo del fabricante. Estos transformantes se sembraron en placas de agar LB con 100 µg/ml de carbenicilina (Teknova) y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Después de crecimiento durante 18 horas, se recogieron las colonias y se inocularon en 1 ml de caldo T (Teknova), que contenía 100 µg/ml de carbenicilina en un placa de 96 pocillos honda y se dejó crecer durante toda la noche en una incubadora con agitación a 37°C. Después de 18 a 24 horas de crecimiento, se aisló el ADN de cada cultivo nocturno, con el uso del kit QIAprep 96 Turbo (Qiagen) en el equipo BioRobot8000 (Qiagen). Luego, se digirieron 10 µL de cada clon con enzimas de restricción HindIII y XhoI en solución amortiguadora B 1X en un volumen de reacción de 15 µL. El ADN digerido se sometió a electroforesis en E-geles de agarosa al 1% (Invitrogen, CA) para el análisis de los sitios de restricción. Se verificó la secuencia de los clones que contenían un fragmento HindIII-XhoI del tamaño correcto. El G28-1 HL SMIP se construyó de manera similar, colocando un sitio PinAI en el extremo 5' y un ligador (G4S)4 que termina en un sitio Nhe I de la G28-1 VH utilizando los cebadores 29, 30, 31 y 32 de la Tabla X precedente. La VK se alteró por PCR usando los cebadores 33 y 34

de la Tabla X, de manera tal que el sitio NheI se introdujo en el extremo 5' de VK y XhoI en el extremo 3'. Las PCR luego se combinaron como se indicó previamente, y se amplificó con los cebadores flanqueadores 29 y 34 para proporcionar ADN G28-1 scFv intacto en la orientación VH-VL que se clonó en pD18-(n2H7)sssIgG1 SMIP digerido con PinAI-XhoI exactamente como con el G28-1 LH SMIP.

Construcción 2H7sssIgG1-STD1-G28-1 LH/HL

Con el uso de los SMIP G28-1 LH y G28-1 HL como plantillas, se alteraron los dominios de enlace anti-CD37 LH y HL anti-CD37 por PCR, de manera que sus sitios de restricción flanqueadores fueron compatibles con el casete de escorpión. Se introdujo un sitio EcoRI en el extremo 5' de cada scFv usando el cebador 27 (LH) o 36 (HL) y un codón de detención/sitio XbaI en el extremo 3' usando el cebador 28 (LH) ó 35 (HL). Los ADN resultantes se clonaron en pD18-2H7sssIgG-STD1 digerido por EcoRI-XbaI.

Construcción 2H7sssIgG1-Hx-G28-1 HL

Se digirieron ADN 2H7sssIgG1-Hx-2e12 HL con BsrGI y EcoRI y el fragmento 325 bp que constaba del extremo C terminal de la IgG1 y ligador. Éstos se sustituyeron por la región equivalente en 2H7sssIgG1-STD1-G19-4 HL mediante la remoción del ligador STD1 utilizando BsrGI-EcoRI y reemplazándolo con los correspondientes ligadores de los clones 2H7sssIgG1-Hx-2e12 HL.

Construcción del dominio de enlace anti-CD3

Tabla 4

Nº	**Nombre**	**Secuencia**	**SEQ ID NO**
37	194-LH-LF1	GCGTATGAACCGGTGACATCCAGAT GACACAGACTACATC	67
38	194-LF2	ATCCAGATGACACAGACTACATCCT	

Nº	Nombre	Secuencia	SEQ ID NO
		C CCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAG	68
39	194-LF3	GTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTC A CCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGA C	69
40	194-LF4	GTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTCG C AATTATTTAAACTGGTATCAGCAG	70
41	194-LF5	ATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCA G ATGGAACTGTTAAACTCCTGATC	71
42	194-LF6	GAACTGTTAAACTCCTGATCTACTAC A CATCAAGATTACACTCAGGAGTC	72
43	194-LF7	CAAGATTACACTCAGGAGTCCCATC AA GGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAA C	73
44	194-LR7	CAGGTTGGCAATGGTGAGAGAATAA TC TGTTCCAGACCCACTGCCACTGAAC	74
45	194-LR6	GCAAAAGTAAGTGGCAATATCTTCT GGT TGCAGGTTGGCAATGGTGAGAG	75

Nº	Nombre	Secuencia	SEQ ID NO
46	194-LR5	GAACGTCCACGGAAGCGTATTACCC TGTTGGCAAAAGTAAGTGGCAATAT C	76
47	194-LR4	CGTTTGGTTACCAGTTTGGTGCCTC CAC CGAACGTCCACGGAAGCGTATTAC	77
48	194-LR3	ACCACCGCCCGAGCCACCGCCACC CCGTTTGGTTACCAGTTTGGTG	78
49	194-LR2	GCTAGCGCTCCCACCTCCTCCAGAT CCA CCACCGCCCGAGCCACCGCCAC	79
50	194-LH-LR1	GTTGCAGCTGGACCTCGCTAGCGCT CCCACCTCCTCCAGATC	80
51	194-LH-HF1	GATCTGGAGGAGGTGGGAGCGCTA GC GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGAC CTG	81
52	194-HF2	AGCTGCAACAGTCTGGACCTGAACT GGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAG	82
53	194-HF3	AGCCTGGAGCTTCAATGAAGATTTC C TGCAAGGCCTCTGGTTACTCATTC	83
54	194-HF4	GCAAGGCCTCTGGTTACTCATTCAC T GGCTACATCGTGAACTGGCTGAAGC	84

193

Nº	Nombre	Secuencia	SEQ ID NO
		AG	
55	194-HF5	ATCGTGAACTGGCTGAAGCAGAGCC ATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGG AC	85
56	194-HF6	GAACCTTGAGTGGATTGGACTTATT A ATCCATACAAAGGTCTTACTACCTAC	86
57	194-HR6	AATGTGGCCTTGCCCTTGAATTTCT G GTTGTAGGTAGTAAGACCTTTGTAT G	87
58	194-HR5	CATGTAGGCTGTGCTGGATGACTTG T CTACAGTTAATGTGGCCTTGCCCTT G	88
59	194-HR4	ACTGCAGAGTCTTCAGATGTCAGAC TG AGGAGCTCCATGTAGGCTGTGCTGG ATG	89
60	194-HR3	ACCATAGTACCCAGATCTTGCACAG TAATAGACTGCAGAGTCTTCAGATG TC	90
61	194-HR2	GCGCCCCAGACATCGAAGTACCAGT C CGAGTCACCATAGTACCCAGATCTT	91

Nº	Nombre	Secuencia	SEQ ID NO
		G	
62	194-LH-HR1	GCGAATACTCGAGGAGACGGTGACCG TGGTCCCTGCGCCCCAGACATCGAAG	92
63	194-HL-HF1	GCGTATGAACCGGTGAGGTCCAGC TGCAACAGTCTGGACCTG	93
64	194-HL-HR1	ACCGCCACCAGAGGAGACGGTGACCGT GGTCCCTGCGCCCCAGACATCGAAGTAC	94
65	194-HL-HR0	ACCTCCTCCAGATCCACCACCGCCCG AGCCACCGCCACCAGAGGAGACGGTG	95
66	194-HL-LF1	GCGGGGGAGGTGGCAGTGCTAGCGA CATCCAGATGACACAGACTACATC	96
67	194-HL-LR3Xho	GCGAATACTCGAGCGTTTGGTTACCA GTTTGGTG	97
68	194-HL-LR3Xba	GCGATATCTAGATTACCGTTTGGTTAC CAGTTTGGTG	98
69	194-HL-HF1R1	GCGTATGAGAATTCAGAGGTCCAGC	

Nº	Nombre	Secuencia	SEQ ID NO
		TG CAACAGTCTGGACCTG	99
70	194-LH-LF1R1	GCGTATGAGAATTCTGACATCCAGA TGACACAGACTACATC	100
71	194-LH-HR1Xba	GCGTATCTAGATTAGGAGACGGTGA CC GTGGTCCCTGCGCCCCAGACATCG AAG	101

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para generar dominio de enlace anti-CD3 a partir de la secuencia G19-4 scFv.

El dominio de enlace G19-4 se sintetizó por extensión de los cebadores oligonucleótidos superpuestos, como se indicó. La PCR de la cadena ligera se llevó a cabo en dos etapas, empezando por combinar los cebadores 43/44, 42/45, 41/46 y 40/47 en concentraciones de 5 uM, 10 µM, 20 µM y 40 µM, respectivamente en Platinum PCR Supermix Hi-Fidelity durante 30 ciclos: a 94°C, 20 segundos; 60°C, 10 segundos; 68°C, 15 segundos. Un µL del producto de PCR resultante se reamplificó utilizando una mezcla de cebadores 39/48 (10 µM), 38/49 (20 µM) y 37/50 (40 µM) o 66/67 (40 µM) para la orientación HL, utilizando las mismas condiciones de PCR con excepción de la extensión a 68°C, que se aumentó a 25 segundos. El VK en la orientación LH se enlazó a PinAI en el extremo 5' y Nhel en el extremo 3', mientras que la orientación HL tenía Hhel en el extremo 5' y XhoI en el extremo 3'.

Para sintetizar la cadena pesada, las mezclas de cebadores con las mismas concentraciones descriptas se elaboraron combinando los cebadores 56/57, 55/58,

54/59 y 53/60 para el primer paso de PCR. En la segunda PCR, los cebadores 52/61 (20 µM) y 51/62 (50 µM) se amplificaron con 1 µl de la primera PCR utilizando las mismas condiciones que la segunda PCR de la cadena ligera, para hacer la orientación LH con NheI en el extremo 5' y XhoI en el extremo 3'. Los cebadores 52/61(10 µM), 63/64 (20 µM), 63 (20 µM)/65 (40 µM) y 63(20 µM)/5 (80 µM) se combinaron en una segunda PCR con 1 uL de la PCR previa, para crear la cadena pesada en la orientación HL con PinAI en el extremo 5' y NheI en el extremo 3'. Al igual que con las construcciones anteriores, de diseñó suficiente superposición en los cebadores centrados en torno del sitio NheI, de manera tal que se sintetizó G19-4 LH combinando las PCR de las cadena pesada y ligera en la orientación LH y reamplificando con los cebadores flanqueadores, 37 y 62, y el G19-4 HL se sintetizó combinado las PCR de HL y reamplificando con los cebadores 63 y 67.

Los productos de PCR G19-4 LH/HL de longitud completa se separaron por electroforesis en gel de agarosa, se extirparon del gel y se purificaron con columnas Qiagen MinElute como ya se describió. Estos ADN luego se clonaron con el kit TOPO en pCR2.1 (Invitrogen), se transformaron en TOP10 y se tamizaron las colonias primero por tamaño de fragmento EcoRI, y luego por secuenciamiento de ADN. G19-4 LH/HL se clonaron en pD18-IgG1 mediante PinAI-XhoI para la expresión en células mamíferas.

Construcción 2H7sssIgG1-STD1-G19-4 LH/HL

Con el uso de los SMIP G19-4 LH y G19-4 HL como plantillas, se alteraron los dominios de enlace anti-CD3 LH y HL por PCR, de manera que sus sitios de restricción flanqueadores fueron compatibles con el casete de escorpión. Se introdujo un sitio EcoRI en el extremo 5' de cada scFv usando el cebador 27 (LH) o 36 (HL) y un codón de detención / sitio XbaI en el extremo 3' usando el cebador 28 (LH) ó 35 (HL). Los ADN resultantes se clonaron en pD18-2H7sssIgG-STD1 digerido por EcoRI-XbaI.

Construcción 2H7sssIgG1-Hx-G19-4 HL

Se digirieron ADN 2H7sssIgG1-Hx-2e12 HL con BsrGI y EcoRI y el fragmento 325 bp que constaba del extremo C terminal de la IgG1 y ligador. Éstos se sustituyeron por la región equivalente en 2H7sssIgG1-STD1-G19-4 HL mediante la remoción del ligador STD1 utilizando BsrGI-EcoRI y reemplazándolo con los correspondientes ligadores de los clones 2H7sssIgG1-Hx-2e12 HL.

A partir de la consideración de una variedad de proteínas de enlace multivalentes que se revelan en la presente se aprecian las características de las moléculas que pueden combinarse para formar las moléculas de la invención Las características incluyen el dominio de enlace 1, una subregión constante, que incluye un dominio de bisagra o similar a bisagra, un dominio ligador y un dominio de enlace 2. La modularidad intrínseca en el diseño de estas proteínas de enlace novedosas facilita para el experto en el arte manipular la secuencia de ADN en los extremos N terminal y/o C terminal de cualquier módulo aconsejable, de tal manera que pueda insertarse en casi cualquier posición para crear una molécula nueva que presente funcionalidad alterada o mejorada por comparación con la molécula madre de la cual deriva. Por ejemplo, se contempla que cualquier dominio de enlace derivado de un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas se enlace al dominio 1 o se enlace al dominio 2 de las moléculas según la invención. Los dominios de enlace derivados incluyen dominios que tienen secuencias de aminoácidos, e incluso secuencias polinucleótidas codificantes, que tienen una correspondencia exacta con la secuencia de un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, así como las variantes y los derivados que comparten preferentemente un 80%, 90%, 95%, 99% ó 99,5% de identidad de la secuencia con un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas. Estos dominios de enlace (1 y 2) preferentemente se enlazan a otros módulos de las moléculas, según la invención, a través de los ligadores que pueden variar en términos de secuencias y longitud, según se describe en otro sitio de la presente, siempre que los ligadores sean

suficientes proporcionar el espaciamiento y la flexibilidad que se necesitan para que la molécula logre una estructura terciaria funcional. Otro módulo de las proteínas de enlace multivalentes es la región de bisagra, que puede corresponder a la región de bisagra de un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, pero puede ser una variante, tal como las regiones de bisagra "CSC" o "SSS" que se describen aquí. Además, la subregión constante comprende un módulo de las proteínas según la invención que puede corresponder a una subregión de una región constante de un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, según es tipificado por la estructura de una subregión constante bisagra-C_{H2}- C_{H3}. Las variantes y los derivados de las subregiones constantes también se contemplan, teniendo preferentemente secuencias de aminoácidos que comparten 80%, 90%, 95%, 99%, o 99,5% de la identidad de la secuencia con un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas.

Las estructuras primarias ejemplares de las características de tales moléculas se presentan en la Tabla 5, la cual revela el polinucleótido y la secuencia de aminoácidos cognados de los dominios de enlace ilustrativos 1 y 2, así como la estructura primaria de una subregión constante, incluido un dominio de bisagra o similar a bisagra y un ligador que puede interponerse, por ejemplo, entre el extremo C terminal de una subregión constante y el extremo N terminal de una región del dominio de enlace 2 de una proteína de enlace multivalente. Los ejemplos adicionales de las moléculas según la invención incluyen las características descriptas previamente, donde, por ejemplo, cualquiera o ambos de los dominios de enlace 1 y 2 comprenden un dominio derivado de un dominio V_L o similar a V_L de un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas y un dominio V_H o similar a V_H derivado del mismo -o un diferente- miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, con estos dominios separados por un ligador tipificado por cualquiera de los ligadores revelados aquí. Se contemplan las moléculas en las cuales la orientación de estos dominios es V_L- V_H ó V_H- V_L para BD1 y/o BD2. En la tabla que se incluye al final de esta revelación se encuentra una presentación más

completa de las estructuras primarias de las varias características de las moléculas de enlace multivalentes según la invención. La invención también comprende los polinucleótidos que codifican tales moléculas.

Tabla 5

Dominio de enlace	**Secuencia de nucleótidos**	**Secuencia de aminoácidos**	**SEQ ID NOS (secuencia de aminoácidos)**

Dominio de enlace	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NOS (secuencia de aminoácidos)
2H7 LH	atggattttcaagtgcagattttcagcttcctgct aatcagtgcttcagtcataatgtccagaggac aaattgttctctcccagtctccagcaatcctgtct gcatctccaggggagaaggtcacaatgactt gcagggccagctcaagtgtaagttacatgca ctggtaccagcagaagccaggatcctccccc aaaccctggatttatgccccatccaacctggct tctggagtccctgctcgcttcagtggcagtgggt ctgggacctcttactctctcacaatcagcagag tggaggctgaagatgctgccacttattactgcc agcagtggagttttaacccacccacgttcggtg ctgggaccaagctggagctgaaagatggcg gtggctcgggcggtggtggatctggaggaggt gggagctctcaggcttatctacagcagtctgg ggctgagtcggtgaggcctggggcctcagtg aagatgtcctgcaaggcttctggctacacattt accagttacaatatgcactgggtaaagcaga cacctagacagggcctggaatggattggagc tatttatccaggaaatggtgatacttcctacaat cagaagttcaagggcaaggccacactgact gtagacaaatcctccagcacagcctacatgc agctcagcagcctgacatctgaagactctgcg gtctatttctgtgcaagagtggtgtactatagtaa ctcttactggtacttcgatgtctggggcacagg gaccacggtcaccgtctct	mdfqvqifsfllisasvimsrgqivlsqspailsasp gekvtmtcrasssvsymhwyqqkpgsspkpw iyapsnlasgvparfsgsgsgtsysltisrveaed aatyycqqwsfnpptfgagtklelkdgggsgggg sggggssqaylqqsgaesvrpgasvkmscka sgytftsynmhwvkqtprqglewigaiypgngdt synqkfkgkatltvdkssstaymqlssltsedsav yfcarvvyysnsywyfdvwgtgttvtvs	1 (2)

Dominio de enlace	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NOS (secuencia de aminoácidos)
2e12 LH	atggattttcaagtgcagattttcagcttcctgct aatcagtgcttcagtcataatgtccagaggagt cgacattgtgctcacccaatctccagcttctttg gctgtgtctctaggtcagagagccaccatctcc tgcagagccagtgaaagtgttgaatattatgtc acaagtttaatgcagtggtaccaacagaaac caggacagccacccaaactcctcatctctgct gctagcaacgtagaatctggggtccctgccag gtttagtggcagtgggtctgggacagactttag cctcaacatccatcctgtggaggaggatgata ttgcaatgtatttctgtcagcaaagtaggaaggt tccatggacgttcggtggaggcaccaagctg gaaatcaaacggggtggcggtggatccggc ggaggtgggtcgggtggcggcggatctcagg tgcagctgaaggagtcaggacctggcctggt ggcgccctcacagagcctgtccatcacatgc accgtctcagggttctcattaaccggctatggtg taaactgggttcgccagcctccaggaaagggg tctggagtggctgggaatgatatggggtgatg gaagcacagactataattcagctctcaaatcc agactatcgatcaccaaggacaactccaaga gccaagttttcttaaaaatgaacagtctgcaaa ctgatgacacagccagatactactgtgcccga gatggttatagtaactttcattactatgttatggac tactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctc ctct	MDFQVQIFSFLLISASVIMSRGVDIV LTQSPASLAVSLGQRATISCRASES VEYYVTSLMQWYQQKPGQPPKLLI SAASNVESGVPARFSGSGSGTDFS LNIHPVEEDDIAMYFCQQSRKVPWT FGGGTKLEIKRGGGGSGGGGSGG GGSQVQLKESGPGLVAPSQSLSIT CTVSGFSLTGYGVNWVRQPPGKG LEWLGMIWGDGSTDYNSALKSRLSI TKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTARY YCARDGYSNFHYYVMDYWGQGTS VTVSS	3 (4)

Dominio de enlace	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NOS (secuencia de aminoácidos)
2e12 HL	atggattttcaagtgcagattttcagcttcctgct aatcagtgcttcagtcataatgtccagaggagt ccaggtgcagctgaaggagtcaggacctgg cctggtggcgccctcacagagcctgtccatca catgcaccgtctcagggttctcattaaccggct atggtgtaaactgggttcgccagcctccagga aagggtctggagtggctgggaatgatatggg gtgatggaagcacagactataattcagctctc aaatccagactatcgatcaccaaggacaact ccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagt ctgcaaactgatgacacagccagatactactg tgcccgagatggttatagtaactttcattactatg ttatggactactggggtcaaggaacctcagtc accgtctcctctgggggtggaggctctggtggc ggtggatccggcggaggtgggtcgggtggcg gcggatctgacattgtgctcacccaatctccag cttctttggctgtgtctctaggtcagagagccac catctcctgcagagccagtgaaagtgttgaat attatgtcacaagtttaatgcagtggtaccaac agaaaccaggacagccacccaaactcctca tctctgctgctagcaacgtagaatctggggtcc ctgccaggtttagtggcagtgggtctgggaca gactttagcctcaacatccatcctgtggaggag gatgatattgcaatgtatttctgtcagcaaagta ggaaggttccatggacgttcggtggaggcac caagctggaaatcaaacgt	MDFQVQIFSFLLISASVIMSRGVQV QLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGF SLTGYGVNWVRQPPGKGLEWLGM IWGDGSTDYNSALKSRLSITKDNSK SQVFLKMNSLQTDDTARYYCARDG YSNFHYYVMDYWGQGTSVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVL TQSPASLAVSLGQRATISCRASESV EYYVTSLMQWYQQKPGQPPKLLIS AASNVESGVPARFSGSGSGTDFSL NIHPVEEDDIAMYFCQQSRKVPWT FGGGTKLEIKR	5 (6)

Dominio de enlace	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NOS (secuencia de aminoácidos)
G28-1 LH	accggtgacatccagatgactcagtctccagc ctccctatctgcatctgtgggagagactgtcac catcacatgtcgaacaagtgaaaatgtttaca gttatttggcttggtatcagcagaaacagggaa aatctcctcagctcctggtctcttttgcaaaaac cttagcagaaggtgtgccatcaaggttcagtg gcagtggatcaggcacacagttttctctgaag atcagcagcctgcagcctgaagattctggaa gttatttctgtcaacatcattccgataatccgtgg acgttcggtggaggcaccgaactggagatca aaggtggcggtggctcgggcggtggtgggtc gggtggcggcggatctgctagcgcagtccag ctgcagcagtctggacctgagctggaaaagc ctggcgcttcagtgaagatttcctgcaaggcttc tggttactcattcactggctacaatatgaactgg gtgaagcagaataatggaaagagccttgagt ggattggaaatattgatccttattatggtggtact acctacaaccggaagttcaagggcaaggcc acattgactgtagacaaatcctccagcacagc ctacatgcagctcaagagtctgacatctgagg actctgcagtctattactgtgcaagatcggtcg gccctatggactactggggtcaaggaacctca gtcaccgtctcgag	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRT SENVYSYLAWYQQKQGKSPQLLVS FAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSL KISSLQPEDSGSYFCQHHSDNPWT FGGGTELEIKGGGGSGGGGSGGG GSASAVQLQQSGPELEKPGASVKI SCKASGYSFTGYNMNWVKQNNGK SLEWIGNIDPYYGGTTYNRKFKGKA TLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAV YYCARSVGPMDYWGQGTSVTVS	102 (103)

Dominio de enlace	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NOS (secuencia de aminoácidos)
G28-1 HL	accggtgaggtccagctgcaacagtctggac ctgaactggtgaagcctggagcttcaatgaag atttcctgcaaggcctctggttactcattcactgg ctacatcgtgaactggctgaagcagagccat ggaaagaaccttgagtggattggacttattaat ccatacaaaggtcttactacctacaaccagaa attcaagggcaaggccacattaactgtagac aagtcatccagcacagcctacatggagctcct cagtctgacatctgaagactctgcagtctattac tgtgcaagatctgggtactatggtgactcggac tggtacttcgatgtctggggcgcagggaccac ggtcaccgtctcctctggtggcggtggctcggg cggtggtggatctggaggaggtgggagcgg gggaggtggcagtgctagcgacatccagatg acacagactacatcctccctgtctgcctctctgg gagacagagtcaccatcagttgcagggcaa gtcaggacattcgcaattatttaaactggtatca gcagaaaccagatggaactgttaaactcctg atctactacacatcaagattacactcaggagtc ccatcaaggttcagtggcagtgggtctggaac agattattctctcaccattgccaacctgcaacc agaagatattgccacttacttttgccaacaggg taatacgcttccgtggacgttcggtggaggca ccaaactggtaaccaaacgctcgag	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKA SGYSFTGYIVNWLKQSHGKNLEWI GLINPYKGLTTYNQKFKGKATLTVD KSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCAR SGYYGDSDWYFDVWGAGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSA SDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCR ASQDIRNYLNWYQQKPDGTVKLLIY YTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSL TIANLQPEDIATYFCQQGNTLPWTF GGGTKLVTKRS	104 (105)

Dominio de enlace	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NOS (secuencia de aminoácidos)
G19-4 LH	accggtgacatccagatgacacagactacat cctccctgtctgcctctctgggagacagagtca ccatcagttgcagggcaagtcaggacattcgc aattatttaaactggtatcagcagaaaccagat ggaactgttaaactcctgatctactacacatca agattacactcaggagtcccatcaaggttcag tggcagtgggtctggaacagattattctctcac cattgccaacctgcaaccagaagatattgcca cttacttttgccaacagggtaatacgcttccgtg gacgttcggtggaggcaccaaactggtaacc aaacggggtggcggtggctcgggcggtggtg gatctggaggaggtgggagcgctagcgaggt ccagctgcaacagtctggacctgaactggtga agcctggagcttcaatgaagatttcctgcaag gcctctggttactcattcactggctacatcgtga actggctgaagcagagccatggaaagaacc ttgagtggattggacttattaatccatacaaagg tcttactacctacaaccagaaattcaagggca aggccacattaactgtagacaagtcatccagc acagcctacatggagctcctcagtctgacatct gaagactctgcagtctattactgtgcaagatct gggtactatggtgactcggactggtacttcgat gtctggggcgcagggaccacggtcaccgtct cctcgag	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRA SQDIRNYLNWYQQKPDGTVKLLIYY TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI ANLQPEDIATYFCQQGNTLPWTFG GGTKLVTKRGGGGSGGGGSGGG GSASEVQLQQSGPELVKPGASMKI SCKASGYSFTGYIVNWLKQSHGKN LEWIGLINPYKGLTTYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVY YCARSGYYGDSDWYFDVWGAGTT VTVSS	106 (107)

Dominio de enlace	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NOS (secuencia de aminoácidos)
G19-4 HL	accggtgaggtccagctgcaacagtctggac ctgaactggtgaagcctggagcttcaatgaag atttcctgcaaggcctctggttactcattcactgg ctacatcgtgaactggctgaagcagagccat ggaaagaaccttgagtggattggacttattaat ccatacaaaggtcttactacctacaaccagaa attcaagggcaaggccacattaactgtagac aagtcatccagcacagcctacatggagctcct cagtctgacatctgaagactctgcagtctattac tgtgcaagatctgggtactatggtgactcggac tggtacttcgatgtctggggcgcagggaccac ggtcaccgtctcctctggtggcggtggctcggg cggtggtggatctggaggaggtgggagcgct agcgacatccagatgacacagactacatcct ccctgtctgcctctctgggagacagagtcacc atcagttgcagggcaagtcaggacattcgca attatttaaactggtatcagcagaaaccagatg gaactgttaaactcctgatctactacacatcaa gattacactcaggagtcccatcaaggttcagt ggcagtgggtctggaacagattattctctcacc attgccaacctgcaaccagaagatattgccac ttacttttgccaacagggtaatacgcttccgtgg acgttcggtggaggcaccaaactggtaacca aacgctcgag	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKA SGYSFTGYIVNWLKQSHGKNLEWI GLINPYKGLTTYNQKFKGKATLTVD KSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCAR SGYYGDSDWYFDVWGAGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSASDIQMT QTTSSLSASLGDRVTISCRASQDIR NYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLH SGVPSRFSGSGSGTDYSLTIANLQP EDIATYFCQQGNTLPWTFGGGTKL VTKRS	108 (109)

Región de bisagra	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO (secuencia de aminoácidos)
sss(s)-hIgG1	gagcccaaatcttctgacaaaactcacac atctccaccgagctca	EPKSSDKTHTSPPSS	230 (231)
csc(s)-hIgG1	gagcccaaatcttgtgacaaaactcacac atctccaccgtgctca	EPKSCDKTHTSPPCS	232 (233)
ssc(s)-hIgG1	gagcccaaatcttctgacaaaactcacac atctccaccgtgctca	EPKSSDKTHTSPPCS	110 (111)
scc(s)-hIgG1	gagcccaaatcttctgacaaaactcacac atgtccaccgtgctca	EPKSSDKTHTCPPCS	112 (113)
css(s)-hIgG1	gagcccaaatcttgtgacaaaactcacac atctccaccgagctca	EPKSCDKTHTSPPSS	114 (115)
scs(s)-hIgG1	gagcccaaatcttgtgacaaaactcacac atgtccaccgagctca	EPKSSDKTHTCPPSS	116 (117)
ccc(s)-hIgG1	gagcccaaatcttgtgacaaaactcacac atgtccaccgtgctca	EPKSCDKTHTSPPCS	118 (119)
ccc(p)-hIgG1	gagcccaaatcttgtgacaaaactcacac atgtccaccgtgccca	EPKSCDKTHTSPPCP	120 (121)
sss(p)-hIgG1	gagcccaaatcttctgacaaaactcacac atctccaccgagccca	EPKSSDKTHTSPPSP	122 (123)
csc(p)-hIgG1	gagcccaaatcttgtgacaaaactcacac atctccaccgtgccca	EPKSCDKTHTSPPCP	124 (125)
ssc(p)-hIgG1	gagcccaaatcttctgacaaaactcacac atctccaccgtgccca	EPKSSDKTHTSPPCP	126 (127)
scc(p)-hIgG1	gagcccaaatcttctgacaaaactcacac atgtccaccgtgccca	EPKSSDKTHTCPPCP	128 (129)
css(p)-hIgG1	gagcccaaatcttgtgacaaaactcacac atctccaccgagccca	EPKSCDKTHTSPPSP	130 (131)

scs(p)-hIgG1	gagcccaaatcttgtgacaaaactcacac atgtccaccgagccca	EPKSSDKTHTCPPSP	132 (133)
scppcp	agttgtccaccgtgccca	SCPPCP	134 (135)
EFD	**Secuencia de nucleótidos**	**Secuencia de aminoácidos**	**identificador de la secuencia (secuencia de aminoácidos)**
hIgG1 (P238S) $C_{H2}C_{H3}$	gcacctgaactcctgggtggatcgtcagtc ttcctcttcccccaaaacccaaggacac cctcatgatctcccggacccctgaggtcac atgcgtggtggtggacgtgagccacgaa gaccctgaggtcaagttcaactggtacgtg gacggcgtggaggtgcataatgccaaga caaagccgcgggaggagcagtacaaca gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccg tcctgcaccaggactggctgaatggcaag gagtacaagtgcaaggtctccaacaaag ccctcccagcccccatcgagaaaacaat ctccaaagccaaagggcagccccgaga accacaggtgtacaccctgcccccatccc gggatgagctgaccaagaaccaggtcag cctgacctgcctggtcaaaggcttctatccc agcgacatcgccgtggagtgggagagca atgggcagccggagaacaactacaaga ccacgcctcccgtgctggactccgacggc tccttcttcctctacagcaagctcaccgtgg acaagagcaggtggcagcaggggaac gtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctct gcacaaccactacacgcagaagagcctc tccc tgtctccgggtaaatga	APELLGGSSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	142 (143)

hIgG1	gcacctgaactcctgggtggaccgtcagt	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI	144 (145)
(P331S)	cttcctcttccccccaaaacccaaggaca	SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF	
$C_{H2}C_{H3}$	ccctcatgatctcccggacccctgaggtca	NWYVDGVEVHNAKTKPREEQY	
	catgcgtggtggtggacgtgagccacgaa	NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK	
	gaccctgaggtcaagttcaactggtacgtg	EYKCKVSNKALPASIEKTISKAK	
	gacggcgtggaggtgcataatgccaaga	GQPREPQVYTLPPSRDELTKN	
	caaagccgcgggaggagcagtacaaca	QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES	
	gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccg	NGQPENNYKTTPPVLDSDGSF	
	tcctgcaccaggactggctgaatggcaag	FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC	
	gagtacaagtgcaaggtctccaacaaag	SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
	ccctcccagcctccatcgagaaaacaatc	K	
	tccaaagccaaagggcagccccgagaa		
	ccacaggtgtacaccctgcccccatcccg		
	ggatgagctgaccaagaaccaggtcagc		
	ctgacctgcctggtcaaaggcttctatccca		
	gcgacatcgccgtggagtgggagagcaa		
	tgggcagccggagaacaactacaagac		
	cacgcctcccgtgctggactccgacggct		
	ccttcttcctctacagcaagctcaccgtgga		
	caagagcaggtggcagcaggggaacgt		
	cttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg		
	cacaaccactacacgcagaagagcctct		
	ccc tgtctccgggtaaatga		

hIgG1 (P238S/ P331S) $C_{H2}C_{H3}$	gcacctgaactcctgggtggatcgtcagtc ttcctcttcccccaaaacccaaggacac cctcatgatctcccggacccctgaggtcac atgcgtggtggtggacgtgagccacgaa gaccctgaggtcaagttcaactggtacgtg gacggcgtggaggtgcataatgccaaga caaagccgcgggaggagcagtacaaca gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccg tcctgcaccaggactggctgaatggcaag gagtacaagtgcaaggtctccaacaaag ccctcccagcctccatcgagaaaacaatc tccaaagccaaagggcagccccgagaa ccacaggtgtacaccctgcccccatcccg ggatgagctgaccaagaaccaggtcagc ctgacctgcctggtcaaaggcttctatccca gcgacatcgccgtggagtgggagagcaa tgggcagccggagaacaactacaagac cacgcctcccgtgctggactccgacggct ccttcttcctctacagcaagctcaccgtgga caagagcaggtggcagcaggggaacgt cttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg cacaaccactacacgcagaagagcctct ccctgtctccgggtaaatga	APELLGGSSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPASIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	146 (147)
Ligador	**Secuencia de nucleótidos**	**Secuencia de aminoácidos**	**identificador de la secuencia**
STD1	aattatggtggcggtggctcgggcggtggt ggatctggaggaggtgggagtgggaattc t	NYGGGGSGGGGSGGGGSGN S	148 (149)

STD2	aattatggtggcggtggctcgggcggtggt ggatctggaggaggtgggagtgggaatta tggtggcggtggctcgggcggtggtggat ctggaggaggtgggagtgggaattct	NYGGGGSGGGGSGGGGSGN YGGGGSGGGGSGGGGSGNS	150 (151)
H1	aattct	NS	152 (153)
H2	ggtggcggtggctcggggaattct	GGGGSGNS	154 (155)
H3	aattatggtggcggtggctctgggaattct	NYGGGGSGNS	156 (157)
H4	ggtggcggtggctcgggcggtggtggatc tgggaattct	GGGGSGGGGSGNS	158 (159)
H5	aattatggtggcggtggctcgggcggtggt ggatctgggaattct	NYGGGGSGGGGSGNS	160 (161)
H6	ggtggcggtggctcgggcggtggtggatc tgggggaggaggcagcgggaattct	GGGGSGGGGSGGGGSGNS	162 (163)
H7	gggtgtccaccttgtccgaattct	GCPPCPNS	164 (165)
(G4S)3	ggtggcggtggatccggcggaggtgggt cgggtggcggcggatct	GGGSGGGSGGGS	166 (167)
(G4S)4	ggtggcggtggctcgggcggtggtggatc tggaggaggtgggagcgggggaggtgg cagt	GGGSGGGSGGGSGGGGS	168 (169)

Tabla 5. Estructuras primarias (secuencias de polinucleótidos y aminoácidos cognados) de los ejemplos de características de moléculas de enlace multivalentes

Ejemplo 8

Estudios de enlace y funcionales con proteínas de fusión multiespecíficas alternativas

Se realizaron experimentos que paralelizan los experimentos descriptos previamente para la molécula de enlace (de fusión) multiespecífica CD20-IgG-CD28 prototípica para cada una de las moléculas de enlace multivalente adicional que se describió previamente. En general, los datos obtenidos para estas moléculas

adicionales paralelizan los resultados observados para la molécula prototipo. A continuación se describen algunos de los resultados más destacados de estos experimentos. La Figura 14 muestra los resultados de los estudios de bloqueo realizados sobre una de las nuevas moléculas, donde tanto BD1 como BD2 se enlazan a los antígenos diana en la misma célula o tipo celular, en este caso CD20 y CD37. Esta proteína de enlace (de fusión) multivalente multiespecífica se diseñó con el dominio de enlace 1 que enlaza CD20 (2H7; orientación VLVH), y el dominio de enlace 2 CD37, G28-1 VL-VH (LH) o VH-VL (HL). El experimento se realizó a fin de demostrar las propiedades multiespecíficas de la proteína.

Estudios de bloqueo: Se preincubaron células linfoblastoides B Ramos o BJAB ($2,5 \times 10^5$) en placas de fondo en V de 96 pocillos en medio de tinción (PBS con 2% de suero de ratón), con anticuerpo anti-CD20 murino (25 μg/ml) o anticuerpo anti-CD37 murino (10 μg/ml), ambos juntos o con medio de tinción solamente durante 15 minutos sobre hielo en la oscuridad. Los anticuerpos bloqueantes se preincubaron con células durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de agregar la proteína de enlace (de fusión) multiespecífica en los rangos de concentración indicados, usualmente de 0,02 mg/ml a 10 mg/ml, y se incubaron durante otros 45 minutos sobre hielo en la oscuridad. Las células se lavaron 2 veces en medio de tinción, y se incubaron durante una hora en hielo con anticuerpo anti-IgG humana de caprino conjugado en FITC Caltag (Burlingame, CA) (1:100) en medio de tinción, a fin de detectar el enlace de las proteínas de enlace (de fusión) multiespecíficas a las células. Luego las células se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con 1% de paraformaldehído (número de catálogo 19943, USB, Cleveland, Ohio). Las células se analizaron por citometría de flujo con el empleo de un instrumento FACsCalibur y software CellQuest (BD Biosciences, San Jose, CA). Cada serie de datos grafica el enlace de la proteína de fusión 2H7-sss-hIgG-STD1-G28-1 HL en la presencia de los anticuerpos de bloqueo CD20, CD37, o de CD20 y CD37 juntos. Aún cuando este experimento utilizó uno de los ligadores

clivados, sólo la presencia de ambos anticuerpos bloqueantes eliminó completamente el enlace por parte de la proteína de enlace (de fusión) multiespecífica, lo cual demuestra que el grueso de las moléculas posee función de enlace, tanto para CD20 como para CD37. Los datos fueron similares para las dos líneas celulares testeadas en los paneles A y B, Ramos y BJAB, donde el anticuerpo de bloqueo CD20 resultó más eficaz que el anticuerpo de bloqueo CD37 para reducir el nivel de enlace observado por la proteína de enlace (de fusión) multiespecífica.

Ensayos de ADCC

La Figura 15 muestra los resultados de los ensayos de ADCC realizados sobre las proteínas de enlace (de fusión) multiespecíficas CD20-CD37. Los ensayos de ADCC se realizaron con el empleo de linfocitos B linfoblastoides BJAB como dianas, y PBMC como células efectoras. Las linfocitos BJAB se marcaron con 500 µCi/ml ^{51}Cr de cromato de sodio (250 µCi/µg) durante 2 horas a 37°C en IMDM/10% de FBS. Las células marcadas se lavaron tres veces en RPMI/10% de FBS y se resuspendieron en un nivel de $4x10^5$ células/ml en RPMI. Se obtuvo sangre humana entera y heparinizada de donantes anónimos internos y se aislaron las PBMC mediante fraccionamiento en gradientes de medio de separación de linfocitos (LSM, ICN Biomedical). Se cosecharon las capas de leucocitos y se lavaron dos veces en RPMI/10% de FBS antes de la resuspensión en RPMI/10% de FBS en una concentración final de $5x10^6$ células/ml. Se hizo el recuento de células con el método de exclusión con azul de triptano utilizando un hemacitómetro antes de su empleo en ensayos posteriores. Se agregaron muestras de reactivo al medio RPMI con 10% de FBS en 4 veces la concentración final y se prepararon tres diluciones en series de 10 veces para cada reactivo. Estos reactivos se agregaron luego a placas de 96 pocillos con fondo en U de 50 µl/pocillo para las concentraciones finales indicadas. Los linfocitos BJAB marcadas con ^{51}Cr se agregaron a las placas en un nivel de 50 µl/pocillo ($2x10^4$ células/pocillo). Las PBMC luego se agregaron a las placas en un nivel de 100 µl/pocillo (5×10^5 células/pocillo) para

alcanzar una proporción final de 25:1 efector (PBMC):diana (BJAB). Se agregaron efectores y dianas al medio solo para medir la destrucción de fondo. Las células marcadas con ^{51}Cr se agregaron al medio solo para medir la liberación espontánea de ^{51}Cr y a medio con 5% de NP40 (número de catálogo 28324, Pierce, Rockford, IL) para medir la liberación máxima de ^{51}Cr. Las reacciones se establecieron en pocillos triplicados de una placa de 96 pocillos. Se agregaron proteínas de enlace (de fusión) a los pocillos en una concentración final que iba de 0,01 mg/ml a 10mg/ml, según se indica en los gráficos. Cada serie de datos grafica una proteína de enlace (de fusión) multiespecífica diferente o los correspondientes SMIP monoespecíficos en los rangos de titulación que se describieron. Se dejaron avanzar las reacciones durante 6 horas a 37°C en 5% de CO_2 antes de proceder a la cosecha y el recuento. Veinticinco µl del sobrenadante de cada pocillo se transfirieron a una placa Luma de 96 pocillos (número de catálogo 6006633, Perkin Elmer, Boston, Mass) y se secaron durante toda la noche a temperatura ambiente. La CPM liberada se midió en un equipo Packard TopCounNXT. Se calculó la destrucción específica porcentual restando (cpm {media de las muestras triplicadas} de muestra - cpm de liberación espontánea)/(cpm de liberación máxima - cpm de liberación espontánea) x100. Los datos se grafican como % de destrucción específica respecto de la concentración de proteínas. Los datos demuestran que la proteína de enlace (de fusión) multiespecífica puede mediar la actividad de ADCC contra las células que expresan el o los antígenos diana, al igual que los SMIP monoespecíficos para CD20 y/o CD37, pero no muestra aumento en el nivel de esta función efectora.

Experimentos de cultivo concurrentes

La Figura 16 muestra los resultados de los experimentos diseñados para buscar otras propiedades de este tipo de proteína de enlace (de fusión), donde el hecho de tener dos dominios de enlace contra las dianas expresadas en la misma célula o mismo tipo celular podría resultar en efectos sinérgicos mediante la señalización/enlazamiento

a través de los dos receptores superficiales enlazados. Los experimentos de cultivos concurrentes se realizaron con el empleo de PBMC aisladas, tal como se describe para los ensayos de ADCC indicados. Estas PBMC se resuspendieron en medio cultivo en un nivel de 2 x 10^6 células/ml, con un volumen final de 500 µl/pocillo, y se cultivaron solas o bien con SMIP monoespecíficos para CD20, CD37, CD20+CD37, o bien la proteína de enlace (de fusión) multiespecífica utilizando el ligador H7, [2H7-sss-IgG-H7-G28-1 HL]. Cada uno de los reactivos de prueba se agregó en una concentración final de 20 µg/ml. Después de 24 horas de cultivo, no se detectaron diferencias reales en el porcentaje de linfocitos B en el cultivo; sin embargo, cuando las células se sometieron a citometría de flujo, se evidenció aglomeración de células en el patrón de tinción FWD X 90 para los cultivos que contenían la proteína de enlace (de fusión) multiespecífica, lo cual indicó que los linfocitos B que expresaban los dos antígenos diana participaron en la adhesión homotípica. Después de 72 horas en cultivo, la proteína (de fusión) multiespecífica derivó en la muerte de prácticamente todos los linfocitos B presentes. La combinación de los dos SMIP monoespecíficos también redujo drásticamente el porcentaje de linfocitos B, pero no el nivel visto con la molécula de enlace multiespecífica. Estos datos sugieren que el acople de ambos dominios de enlace para CD20 y CD37 en la misma molécula multiespecífica, da como resultado la adhesión homotípica entre los linfocitos B, y también puede derivar en el enlace de ambos antígenos, CD20 y CD37, en la misma célula. Sin estar sujetos a una teoría, el efecto sinérgico de eliminar las células diana puede obedecer a (1) el enlace a través de los dominios de enlace 1 y 2 sobre los mismos tipos celulares, y/o (2) interacciones del dominio de función efectora (subregión constante) de las moléculas de enlace multivalentes con monocitos u otros tipos celulares en el cultivo de PBMC que da como resultado la destrucción demorada. La cinética de este efecto destructor no es rápida, y demora más de 24 horas en lograrse, lo cual indica que esto puede ser un efecto

secundario que requiere la producción de citoquinas u otras moléculas antes de que se observen los efectos.

Ensayos de apoptosis

La Figura 17 muestra los resultados de experimentos diseñados para explorar la inducción de apoptosis después del tratamiento de las líneas celulares B con las proteínas de enlace (de fusión) multivalentes y multiespecíficas [2H7-sss-hIgG-H7-G28-1 HL] o CD20 y/o CD37 SMIP monoespecíficos, solos o en combinación uno con otro. Se incubaron células Ramos (panel A; ATCC No. CRL-1596), y células Daudi (panel B; ATCC No. CCL-213) durante toda la noche (24 horas) a 37°C en 5% de CO_2 en medio completo Iscoves (Gibco) con 10% de FBS en un nivel de 3 X 10^5 células/ml y 5, 10 ó 20 μg/ml de proteínas de fusión. Para los experimentos de combinaciones con SMIP monoespecíficos, las proteínas se utilizaron en las siguientes concentraciones: TRU-015 (SMIP dirigido a CD20)=10 μg/ml, con 5 μg/ml de G28-1 LH (SMIP dirigido a CD37). Como alternativa se combinó TRU-015=20 μg/ml con G28-1 LH en un nivel de 10 μg/ml. Posteriormente se tiñeron las células con anexina V-FITC y yoduro de propidio utilizando el kit de detección de apoptosis BD Pharmingen (número de catálogo 556547), y se procesó según las instrucciones del kit. Las células se sometieron a suave agitación excéntrica, se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se diluyeron en 400 μl de solución amortiguadora de enlace antes de someterse a análisis. Las muestras se analizaron por citometría de flujo en un instrumento FACsCalibur (Becton Dickinson) utilizando el software Cell Quest (Becton Dickinson). Los datos se presentan en gráficos de columnas que representan el porcentaje de células positivas a anexina V/yoduro de propidio respecto del tipo de tratamiento. Claramente, la proteína de enlace (de fusión) multiespecífica puede inducir un nivel significativamente más elevado de muerte apoptótica en ambas líneas celulares que los reactivos monoespecíficos, incluso cuando se utilizan en forma conjunta. Esta

mayor actividad funcional refleja una interacción del enlace coordinado de los receptores BD1 y BD2 (específicos para CD20 y CD37) en células diana.

Ejemplo 9

Enlace y propiedades funcionales de proteínas de enlace (de fusión) multiespecíficas 2H7-hIgG-G19-4

Este ejemplo describe el enlace y las propiedades funcionales de las proteínas de fusión multiespecíficas 2H7-hIgG-G19-4. La construcción de estas moléculas se describe en el Ejemplo 7. La expresión y la purificación son como se describen en los Ejemplos anteriores.

Los experimentos de enlace se realizaron según se describe para las moléculas anteriores, excepto que las células diana usadas para medir el enlace de CD3 fueron las células Jurkat que expresaban CD3 en su superficie. Se hace referencia a la Figura 18, donde el gráfico superior muestra las curvas de enlace obtenidas para el enlace de las moléculas multiespecíficas CD20-CD3 a células Jurkat usando las proteínas purificadas diluidas en serie de 20 a 0,05 μg/ml. La orientación HL de la especificidad G19-4 parece enlazarse mejor al antígeno CD3 que la orientación LH. El panel inferior muestra las curvas de enlace obtenidas para el BD1, el dominio de enlace que reconoce CD20. Todas las moléculas se unen bien, y a un nivel casi equivalente a un SMIP monoespecífico para CD20.

Ensayos de ADCC

Para los datos presentados en la figura 19, los ensayos de ADCC se realizaron según se describe en el Ejemplo anterior. En este caso, las proteínas de fusión fueron todas variantes o combinaciones de 2H7-hIgG-G19-4 de los SMIP monoespecíficos (2H7, específico para CD20) o anticuerpos (G19-4, específicos para CD3). Además, para los datos presentados en el panel inferior de la Figura 19, las células de NK se

eliminaron de las PBMC antes del uso, mediante la depleción de esferas magnéticas usando un aparato separación de columnas de MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) el y microesferas magnéticas CD16 específicas para las células NK (número de catálogo: 130-045-701). Los datos presentados en los dos paneles demuestran que todas las moléculas multiespecíficas CD20-hIgG-CD3 median la ADCC, independientemente de si las células NK se agotan o se usan PBMC totales en el análisis. Para TRU 015 o las combinaciones de G19-4 y TRU015, sólo los cultivos que contienen células NK podrían mediar ADCC. G19-4 no funcionó bien en ningún ensayo contra las dianas de BJAB, que no expresan CD3, aunque G19-4 puede haberse enlazado a la molécula CD3 que expresa los linfocitos T NK y activado estas células en el primer análisis que se muestra. La destrucción observada en el panel inferior para las proteínas de enlace (de fusión) multiespecíficas probablemente es mediada por la activación de la citotoxicidad en la población de linfocitos T al unir CD3, contra las dianas BJAB que expresan el antígeno CD20. Esta actividad destructiva parece ser relativamente insensible a la dosificación de las moléculas en los rangos de concentración usados y es todavía significativamente diferente de las otras moléculas probadas, aún a una concentración de 0,01 ug/ml.

Ejemplo 10

Moléculas de enlace multivalentes

Otras formas de realización incluyen dominios ligadores derivados de las inmunoglobulinas. Más específicamente, las secuencias fuente para estos ligadores son las secuencias obtenidas por la comparación de las regiones presentes entre los dominios similares a V o los dominios similares a V y C de otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas. Dado que estas secuencias se expresan generalmente como parte del dominio extracelular de los receptores de la superficie celular, se espera que sean más estables al clivado proteolítico, y tampoco deben ser

inmunógenos. Un tipo de secuencia que no se espera que sea como útil en la función de un ligador para las proteínas de enlace (de fusión) multivalentes es el tipo de secuencia expresada en los miembros expresados por superficie de la superfamilia de Ig, pero que se producen en la región intermedia entre el dominio similar a C y el dominio de transmembrana. Muchas de estas moléculas se han observado en la forma soluble y se clivan en estas regiones intermedias cerca de la membrana celular, indicando que las secuencias son más susceptibles a la división que el resto de la molécula.

Los ligadores descriptos anteriormente se insertan en un SMIP monoespecífico, entre el dominio de enlace y el dominio de función efectora, o bien se insertan en una de las dos posiciones ligadoras posibles en una proteína de enlace (de fusión) multivalente, según se describe aquí.

Una lista completa de las secuencias reveladas en esta aplicación se adjunta y se incorpora aquí por referencia en su totalidad. La codificación en colores que indica la secuencia de diversas regiones o dominios de los polinucleótidos y los polipéptidos particulares es útil para identificar una región o dominio correspondiente en la secuencia de cualquiera de las moléculas reveladas aquí.

Ejemplo 11

Matriz de tamizaje para candidatos escorpión orientados a linfocitos B

Introducción

Como un medio para identificar las combinaciones de los dominios de enlace de anticuerpos monoclonales emparejados que seguramente producirían moléculas de enlace multivalentes potentes, o escorpiones, contra una población diana, una serie de anticuerpos monoclonales contra los antígenos de linfocitos B se probó en una matriz de combinación contra las líneas de linfocitos B que representan diversos linfomas no-Hodgkin. Para asegurar que se analicen todas las comparaciones por pares posibles de

los anticuerpos que se sabe o se espera que se enlacen a la célula de interés, puede usarse una matriz bidimensional de los anticuerpos para guiar el diseño de los estudios usando un tipo de células dado. Los anticuerpos monoclonales contra numerosos antígenos de linfocitos B conocidos mediante sus designaciones de agrupaciones (*cluster designation* - CD) se registran en la columna izquierda. Algunos de estos anticuerpos (designados por el o los antígenos a los cuales se enlazan específicamente), es decir, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 y CL II (MHC de clase II), se incubaron, solos o en combinación con otros miembros de este conjunto de anticuerpos monoclonales, con células diana positivas al antígeno. Los dominios variables de estos anticuerpos se contemplan como dominios de enlace en las formas de realización ejemplares de moléculas de enlace multivalentes. Usando los conocimientos del arte y los procedimientos corrientes, los expertos en el arte pueden identificar las secuencias apropiadas de anticuerpos (ácido nucleico que codifica secuencias así como secuencias de aminoácidos), por ejemplo en bases de datos públicamente disponibles, para generar un anticuerpo o fragmento apropiado (por ejemplo, mediante clonación basada en hibridación, PCR, síntesis de péptidos, y demás similares), y para construir las moléculas de enlace multivalentes usando tales compuestos. Se proporcionan fuentes de anticuerpos ejemplares de los cuales se obtuvieron dominios de enlace según se describe en la Tabla 6. De manera característica, se usará una clonación o estrategia de síntesis que comprende las regiones CDR de una cadena de anticuerpos, aunque se contempla cualquier anticuerpo, fragmento o derivado que retenga la capacidad para enlazarse específicamente a un antígeno diana.

Con más grado de detalle, la clonación de las regiones variables de la cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos de las hibridomas es ordinaria en el arte. No hay ningún requisito en cuanto a que la secuencia de la región variable de interés se conozca para obtener esa región usando las técnicas de clonación convencional. Ver,

por ejemplo, Gilliland y colaboradores, *Tissue Antigens* 47(1):1-20 (1996). Para preparar polipéptidos monocatenarios que comprenden una región variable que reconoce un antígeno de leucocitos murino o humano, se creó un método para la clonación y expresión rápida que produjo proteína funcional dentro de dos a tres semanas de aislamiento de ARN de las células de hibridoma. Las regiones variables fueron clonadas adicionando colas con poli-G al ADNc de la primera hebra, a lo cual le siguió PCR de anclaje con un cebador de anclaje marcado poli-C y un cebador inverso específico para la secuencia de la región constante. Ambos cebadores contenían sitios de endonucleasas de restricción para la inserción en pUC19. Se generaron conjuntos de cebadores de PCR para el aislamiento de genes V_L y V_H murinos, de hámster y rata. Después de determinar las secuencias consenso para un par específico V_L y V_H, los genes V_L y V_H fueron enlazados por el ADN que codifica un ligador peptídico intermedio (que típicamente codifica $(Gly_4Ser)_3$) y los casetes de genes V_L- ligador-V_H fueron transferidos al vector de expresión mamífero pCDM8. Las construcciones se introdujeron por transfección en las células COS y se recuperaron sFvs del sobrenadante del medio de cultivo acondicionado. Este método se ha usado con éxito para generar sFv funcional a CD2, CD3, CD4, CD8, CD28, CD40, CD45 de ser humano y a CD3 y gp39 murinas, de los hibridomas productores de anticuerpos murinos, de ratas o hámsteres. Inicialmente, los sFvs se expresaron como proteínas de fusión con los dominios bisagra-C_{H2}- C_{H3} de la IgG1 humana para facilitar la caracterización y la purificación rápida usando los reactivos anti-IgG humana de caprinos o proteína A. Los sFv activos también pueden expresarse con un péptido pequeño, por ejemplo, una marca o en una forma sin cola. La expresión de formas sin cola de CD3 (G19-4) demostró mayor actividad de señalización celular y reveló que los sFvs tienen potencial para activar los receptores.

Alternativamente, la identificación de la secuencia primaria de aminoácidos de los dominios variables de los anticuerpos monoclonales puede lograrse directamente,

por ejemplo, por la proteólisis limitada del anticuerpo seguida de la secuenciación de péptidos N terminales usando, por ejemplo, el método de degradación de Edman o por la espectroscopia de masas de fragmentación. Los métodos de secuenciación N terminales son bien conocidos en el arte. Después de determinar la secuencia primaria de aminoácidos, los dominios variables, un ADNc que codifica esta secuencia es ensamblado por los métodos de síntesis de ácidos nucleicos sintéticos (por ejemplo, PCR) seguido de generación de scFv. Los métodos de manipulación de ácidos nucleicos necesarios o preferidos son ordinarios en el arte.

Los fragmentos, los derivados y los análogos de los anticuerpos, como se describieron anteriormente, también se contemplan como dominios de enlace apropiados. Aún más, se contempla cualquiera de las subregiones constantes descriptas anteriormente, incluidas las subregiones constantes que comprenden cualquiera de las regiones de bisagra ya indicadas. Además, las moléculas de enlace monocatenarias multivalentes descriptas en este ejemplo pueden incluir cualquiera o todos los ligadores aquí indicados.

Los anticuerpos monoclonales fueron inicialmente expuestos a las células y luego se reticularon usando un anticuerpo de caprinos anti-ratón de segundo paso (2do paso). Optativamente, se pueden reticular los anticuerpos antes de contactar las células con los anticuerpos, por ejemplo, por reticulación de los anticuerpos en la solución. Como otra alternativa, los anticuerpos monoclonales podrían ser reticulados en fase sólida al adsorberse sobre el fondo plástico de los pocillos de cultivo tisular o "quedar atrapados" en este plástico por medio del anticuerpo anti-ratón de caprinos adsorbido al plástico, seguido de los análisis basados en placa para evaluar, por ejemplo, la suspensión del crecimiento o la viabilidad de células.

La inversión de fosfatidilserina del lado citosólico de la membrana celular a la superficie celular externa de esa membrana plasmática es un indicador aceptado de los sucesos proapoptóticos. El avance a la apoptosis conduce a la pérdida de integridad de

la membrana celular, que puede detectarse mediante la entrada de un colorante intercalado impermeable a la célula, por ejemplo, el yoduro de propidio (PI). Después de la exposición de las células a los anticuerpos monoclonales solos o en combinación, se realizó un análisis proapoptótico dual y las poblaciones de células tratadas se calificaron para determinar la inclusión de anexina V (ANN) y/o PI positivo a la superficie celular.

Análisis de internalización de enlace de anexina V/yoduro de propidio

Condiciones de las células y de los cultivos celulares. Se realizaron experimentos para examinar el efecto de la reticulación de dos anticuerpos monoclonales diferentes contra dianas expresadas en cuatro líneas de linfocitos B humanos. Se midieron los efectos sobre las líneas celulares determinando niveles de tinción de ANN y/o PI después de la exposición. Las líneas de linfocitos B humanos BJAB, Ramos (ATCC#CRL-1596), Daudi (ATCC#CCL-213), y DHL-4 (DSMZ#ACC495) se incubaron durante 24 horas a 37°C en 5% de CO_2 en medio completo Iscoves (Gibco) con 10% de FBS. Las células se mantuvieron en una densidad de entre 2-8 x 10^5 células/ml y una viabilidad del >95% antes del estudio.

Se realizaron experimentos en una densidad de células de 2 x 10^5 células/ml y 2 µg/ml de cada anticuerpo monoclonal comparativo de una matriz contra los antígenos de los linfocitos B. Cada anticuerpo monoclonal comparador se agregó a 2 µg/ml solo o individualmente cuando se combinó con cada anticuerpo monoclonal de matriz, también en un nivel de 2 µg/ml. En la Tabla 6 se lista el número del catálogo y las fuentes de suministro de los anticuerpos monoclonales usados en estos experimentos. Para reticular estos anticuerpos monoclonales en solución, la IgG anti-ratón de caprinos (Jackson Labs, número de catálogo 115-001-008) se agregó a cada pocillo a una concentración de 2:1 (anti-ratón de caprinos: cada anticuerpo monoclonal), por ejemplo, un pocillo con sólo un anticuerpo monoclonal en un nivel de 2 µg/ml tendría anti-ratón de caprinos agregado en una concentración final de 4 µg/ml, mientras que los pocillos

con ambos anticuerpos monoclonales comparadores (2 µg/ml) y un anticuerpo monoclonal de la matriz (2 µg/ml) tendrían 8 µg/ml de anticuerpo anti-ratón de caprinos agregado al pozo.

Después de 24 horas de incubación a 37°C en 5% de CO_2, las células se tiñeron con anexina V-FITC y yoduro de propidio usando kit I de detección de apoptosis con anexina V-FITC BD Pharmingen Annexin (#556547). Brevemente, las células se lavaron dos veces con PBS frío y se resuspendieron en "solución amortiguadora de enlace" en 1 x 10^6 células/ml. Cien microlitros de las células en la solución amortiguadora de enlace luego se mancharon con 5 µl de anexina V-FITC y 5 µl de yoduro propidio. Las células se mezclaron suavemente y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. Cuatrocientos microlitros de solución amortiguadora de enlace luego se agregaron a cada muestra. Posteriormente se leyeron las muestras en un equipo FACsCalibur (Becton Dickinson) y se analizaron con el empleo del software Cell Quest (Becton Dickinson).

Tabla 6

Nombre	**Número de catálogo**	**Proveedor comercial**
Anti-CD19	#C2269-74	US Biological (Swampscott, MA)
Anti-CD20	#169-820	Ancell Corp (Bayport, MN)
Anti-CD21	#170-820	Ancell Corp (Bayport, MN)
Anti-CD22	#171-820	Ancell Corp (Bayport, MN)
Anti-CD23	#172-820	Ancell Corp (Bayport, MN)
Anti-CD30	#179-820	Ancell Corp (Bayport, MN)
Anti-CD37	#186-820	Ancell Corp (Bayport, MN)
Anti-CD40	#300-820	Ancell Corp (Bayport, MN)

Nombre	**Número de catálogo**	**Proveedor comercial**
Anti-CD70	#222-820	Ancell Corp (Bayport, MN)
Anti-CD72	#C2428-41B1	US Biological (Swampscott, MA)
Anti-CD79a	#235-820	Ancell Corp (Bayport, MN)
Anti-CD79b	#301-820	Ancell Corp (Bayport, MN)
Anti-CD80	#110-820	Ancell Corp (Bayport, MN)
Anti-CD81	#302-820	Ancell Corp (Bayport, MN)
Anti-CD86	#307-820	Ancell Corp (Bayport, MN)
Anti-CL II DR, DQ, DP	#131-820	Ancell Corp (Bayport, MN)

Tabla 6. Anticuerpos contra antígenos de los linfocitos B utilizados en este estudio y sus fuentes de suministro.

El agregado del anticuerpo de reticulación (por ejemplo, anticuerpo anti-ratón de caprinos) al anticuerpo monoclonal A solo dio lugar a mayor sensibilidad a células, sugiriendo que una molécula de enlace multivalente, o escorpión, construida con dos dominios de enlace que reconocían el mismo antígeno sería eficaz para aumentar la sensibilidad de las células. Sin vernos ceñidos a una teoría en particular, esta mayor sensibilidad puede obedecer al agrupamiento de antígenos y señalización alterada. Los miembros de la familia del receptor del TNF, por ejemplo, requieren homo-multimerización para la transducción de la señal y los escorpiones con dominios de enlace equivalentes en cada extremo de la molécula podrían facilitar esta interacción. El agrupamiento y posterior señalización por CD40 es un ejemplo de este fenómeno en el sistema de linfocitos B.

Según se muestra en las figuras 20, 21 y 22, el agregado del anticuerpo monoclonal A y el anticuerpo monoclonal B contra diferentes antígenos producirá efectos acumulativos -o en algunas combinaciones efectos más que acumulativos (es decir, sinérgicos)- proapoptóticos sobre las células tratadas. En la figura 20, por ejemplo, la combinación de anti-CD20 con anticuerpos monoclonales contra otros antígenos de linfocitos B resultaron, en grados variables, en mayor sensibilidad a células. Algunas combinaciones, tales como anti-CD20 combinado con anti-CD19 o anti-CD20 combinado con anti-CD21, sin embargo, produjeron los efectos proapoptóticos más que acumulativos, indicando que las moléculas de enlace multivalentes o escorpiones compuestas de estos dominios de enlace deben ser particularmente eficaces para eliminar los linfocitos B transformados. Con referencia a la Figura 20, el porcentaje de células que exhiben actividades proapoptóticas cuando se exponen al anticuerpo anti-CD20 solo es aproximadamente 33% (las barras con rayas verticales corresponden a "20", es decir, al anticuerpo anti-CD20); el porcentaje de células proapoptóticas frente a la exposición al anticuerpo anti-CD19 es de aproximadamente el 12% (barras con rayas verticales en la Figura 20 que corresponden a "19", es decir, el anticuerpo anti-CD19); y el porcentaje de células proapoptóticas frente a la exposición a anticuerpos anti-CD20 y anti-CD19 es de aproximadamente el 73% (barras con rayas horizontales en la Figura 20 corresponden a "19". El 73% de células proapoptóticas después de la exposición a ambos anticuerpos es significativamente mayor que la suma del 45% (33% + 12%) de los efectos atribuibles a cada anticuerpo individual, indicando un efecto sinérgico atribuible al par de anticuerpos anti-CD19 y anti-CD 20. Las moléculas de enlace multivalentes útiles incluyen moléculas en las cuales los dos dominios de enlace conducen a un efecto acumulativo en el comportamiento de los linfocitos B al igual que las moléculas de enlace multivalentes en las cuales los dos dominios de enlace provocan los efectos sinérgicos en el comportamiento de linfocitos B. En algunas formas de realización, un dominio de

enlace no tendrá ningún efecto detectable sobre el parámetro medido del comportamiento celular, donde cada uno de los dominios de enlace emparejado contribuye a distintos aspectos de las actividades de la molécula de enlace multivalente, como una molécula de enlace multivalente multiespecífica (por ejemplo, el dominio de enlace A se enlaza a una célula diana y promueve la apoptosis mientras que el dominio de enlace B se une a un terapéutico soluble, tal como una citotoxina). Según el diseño de una molécula de enlace multivalente, la cuestión del tipo de efecto combinado (acumulativo, sinérgico o inhibidor) de los dos dominios de enlace sobre una célula diana puede no ser relevante porque uno de los dominios de enlace es específico para un compañero de enlace acelular (por ejemplo, soluble) o es específico para un compañero de enlace asociado, pero en un tipo celular diferente.

Las formaciones de pares de los dominios de enlace de ejemplo que producen efectos acumulativos, sinérgicos o inhibitorios, según se muestra en las figuras 20-23, se aprecian claramente en la Tablas 7 y 8. La Tabla 7 proporciona datos cuantitativos extraídos de cada una de las Figuras 20-23 en cuanto al porcentaje de células que se manchan positivas a ANN y/o PI. La Tabla 8 proporciona cálculos usando los datos de la Tabla 7 que proporcionaron una base para determinar si la interacción de un par dado de anticuerpos produjo un efecto acumulativo, sinérgico o inhibitorio, nuevamente como se evaluó por el porcentaje de células que presentaron tinción positiva a ANN y/o PI.

Tabla 7

Nombre	**Anti-CD20**	**Anti-CD79b**	**Anti-CL II**	**Anti-CD22**
Anti-CD19	13/73	18/76/66	14/47/46	12/11
Anti-CD20	33/NA	42/94/92	33/71/76	28/33
Anti-CD21	14/75	22/50/76	18/24/40	11/11
Anti-CD22	8/55	12/39/33	12/19/17	10/12

Nombre	Anti-CD20	Anti-CD79b	Anti-CL II	Anti-CD22
Anti-CD23	8/41	12/63/55	14/22/17	10/12
Anti-CD30	8/38	14/72/61	12/56/61	10/11
Anti-CD37	15/45	19/92/86	20/60/62	19/20
Anti-CD40	10/48	12/44/30	13/21/28	14/13
Anti-CD70	9/40	12/56/39	15/21/15	10/10
Anti-CD72	NA	16/60/64	30/78/63	17/17
Anti-CD79a	21/66	43/42/50	28/55/51	14/14
Anti-CD79b	46/88	70/70/68	45/80/76	26/16
Anti-CD80	7/41	14/35/30	15/19/17	11/11
Anti-CD81	14/65	25/86/83	25/54/43	19/20
Anti-CD86	7/38	16/58/42	15/24/18	14/11
Anti- CL II	53/77	52/96/98	47/52/43	72/57

*En las columnas 2-4 de la Tabla 7, los valores numéricos reflejan las alturas de las barras del histograma de las figuras 20-22, respectivamente, donde el primer número en cada célula denota la altura de una barra con rayas verticales, el segundo número denota la altura de una barra con rayas horizontales y, donde se encuentra presente, el tercer número refleja la altura de una barra punteada. En la columna 5, el primer número refleja la altura de una barra sólida y el segundo número refleja la altura de una barra con rayas inclinadas de la figura 23.

Tabla 8

Nombre	Anti-CD20	Anti-CD79b	Anti-CL II	Anti-CD22

Nombre	Anti-CD20	Anti-CD79b	Anti-CL II	Anti-CD22
Anti-CD19	S: 13+33=46	A: 18+56=74 A: 18+43=61	S: 14+26=40 S: 14+18=32	I: 12+10=22
Anti-CD20	NA	A: 42+56=98 A: 42+43=85	S: 33+26=59 S: 33+18=51	A/I:28+10=38
Anti-CD21	S: 14+33=47	I: 22+56=78 S: 22+43=65	I: 18+26=44 A: 18+18=36	I: 11+10=21
Anti-CD22	S: 8+33=41	I: 12+56=68 I: 12+43=55	I: 12+26=38 I: 12+18=30	NA
Anti-CD23	A: 8+33=41	A: 12+56=68 A: 12+43=55	I: 14+26=40 I: 14+18=32	I: 10+10=20
Anti-CD30	A: 8+33=41	A: 14+56=70 A: 14+43=57	S: 12+26=38 S: 12+18=30	I: 10+10=20
Anti-CD37	A: 15+33=48	S: 19+56=75 S: 19+43=62	S: 20+26=46 S: 20+18=38	I: 19+10=29
Anti-CD40	A/S:10+33=43	I: 12+56=68 I: 12+43=55	I: 13+26=39 A: 13+18=31	I: 14+10=24
Anti-CD70	A: 9+33=42	I: 12+56=68 I: 12+43=55	I: 15+26=41 I: 15+18=33	I: 10+10=20
Anti-CD72	NA	I: 16+56=72 A: 16+43=59	S: 30+26=56 S: 30+18=48	I: 17+10=27
Anti-CD79a	S: 21+33=54	I: 43+56=99 I: 43+43=86	A: 28+26=54 A: 28+18=46	I: 14+10=24
Anti-CD79b	S: 46+33=79	NA	S: 45+26=71	I: 26+10=36

Nombre	Anti-CD20	Anti-CD79b	Anti-CL II	Anti-CD22
			S: 45+18=63	
Anti-CD80	A: 7+33=40	I: 14+56=70 I: 14+43=57	I: 15+26=41 I: 15+18=33	I: 11+10=21
Anti-CD81	S: 14+33=47	A: 25+56=81 S: 25+43=68	A: 25+26=51 A: 25+18=43	I: 19+10=29
Anti-CD86	A: 7+33=40	I: 16+56=72 I: 16+43=59	I: 15+26=41 I: 15+18=33	I: 14+11=25
Anti- CL II	I: 53+33=86	A: 52+56=108 A: 52+43=95	NA	I: 72+10=82

"A" significa que se observó un efecto "acumulativo"

"S" significa que se observó un efecto "sinérgico"

"I" significa que se observó un efecto "inhibidor"

Diagrama de la ecuación: A+B=C, donde "A" es el porcentaje de células positivas a ANN y/o PI a causa del anticuerpo de matriz solo; "B" es el porcentaje de células positivas a ANN y/o PI a causa del anticuerpo común (anti-CD20 para la Figura 20, anti-CD79b para la Figura 21, anti-CLII para la Figura 22 y anti-CD22 para la Figura 23) y "C" es el efecto acumulativo esperado. (Ver la Tabla 7, en la cual se presentan los datos cuantitativos correspondientes a las Figuras 20-23). Donde dos ecuaciones están presentes en una célula, la ecuación superior refleja el uso de la mayor concentración indicada del anticuerpo común; la ecuación inferior refleja el uso de la menor concentración indicada del anticuerpo común.

En algunas formas de realización, los dos dominios de enlace interactúan de una manera inhibitoria, acumulativa o sinérgica al sensibilizar (o des-sensibilizador) una célula diana, tal como una célula B. La Figura 23 muestra los efectos protectores o inhibidores que son producto de combinar el anticuerpo anti-CD22 con anticuerpos monoclonales fuertemente proapoptóticos, tales como el anticuerpo anti-CD79b o anticuerpo anti-MHC de clase II (es decir, anti-CL II). Por ejemplo, la Figura 23 y la Tabla 7 muestran que el anticuerpo anti-CD22 solo induce no más de aproximadamente el 10% de células para exhibir el comportamiento proapoptótico (las barras sólidas corresponden a "22" en la Figura 23) y el anticuerpo anti-CD76 induce aproximadamente el 26% de células proapoptóticas (barra sólida correspondiente a "CD79b" en la Figura 23). En la combinación, sin embargo, los anticuerpos anti-CD22 y anti-CD79b inducen sólo cerca de 16% de las células proapoptóticas (barra con rayas inclinadas correspondiente a "79b" en la Figura 23). Por lo tanto, los anticuerpos combinados inducen 16% de las células proapoptóticas, que es menos de la suma de 38% de los efectos individuales atribuibles a anti-CD22 (12%) y anti-CD79b (26%). Con el empleo de este enfoque, una inspección de la Figura 23 y/o las Tablas 7-8 revela que el anticuerpo anti-CD22 y, por extensión, una molécula de enlace multivalente multiespecífica que comprende un dominio de enlace anti-CD22, cuando se usa en combinación independiente con cada uno de los siguientes anticuerpos (o dominios de enlace correspondientes): anticuerpos/dominios de enlace anti-CD19, anti-CD20, anti-CD21, anti-CD23, anti-CD30, anti-CD37, anti-CD40, anti-CD70, anti-CD72, anti-CD79a, anti-CD79b, anti-CD80, anti-CD81, anti-CD86 y anti-MHC clases dará como resultado un efecto inhibido general.

Sin pretender estar limitados por una teoría, los datos pueden interpretarse como indicadores de que el anticuerpo anti-CD22 o una molécula de enlace multivalente multiespecífica que comprende un dominio de enlace anti-CD22, protegerá contra -o mitigará los efectos de- cualquiera de los anticuerpos enumerados inmediatamente

arriba. En un sentido más general, una molécula de enlace multivalente multiespecífica que comprende un dominio de enlace anti-CD22 inhibirá el efecto que es producto de la interacción con cualquiera de las moléculas CD19, CD20, CD21, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD 79a, CD79b, CD80, CD81, CD86, y MHC de clase II . Puede apreciarse en la Figura 23 y la Tabla 8 que el anticuerpo anti-CD22 y, por extensión, un dominio de enlace que comprende un dominio de enlace anti-CD22, funcionará como un inhibidor o mitigador de la actividad de cualquier anticuerpo / dominio de enlace que reconoce un marcador de la superficie de los linfocitos B, tal como un antígeno de CD. Se espera que las moléculas de enlace multivalentes, incluso las moléculas de enlace multivalentes, multiespecíficas resulten útiles para refinar los regímenes de tratamiento para una variedad de enfermedades en las cuales es preciso controlar o atenuar la actividad del dominio de enlace.

Además del efecto combinado inhibitorio, acumulativo o sinérgico de dos dominios de enlace que interactúan con una célula diana, de manera característica mediante la unión de los ligandos de la superficie celular, los resultados experimentales revelados aquí establecen que un par dado de dominios de enlace puede proporcionar un tipo diferente de efecto combinado según las concentraciones relativas de los dos dominios de enlace, de ese modo aumentando la versatilidad de la invención. Por ejemplo, la Tabla 8 revela que los anticuerpos anti-CD21 y anti-CD79b interactúan de una manera inhibitoria en una mayor concentración probada de anti-CD79b, pero estos dos anticuerpos interactúan de una manera sinérgica en una menor concentración probada de anti-CD79b. Aunque algunas formas de realización usarán una molécula de enlace multivalente de un tipo, es decir, una molécula de enlace multivalente monoespecífica, que comprende, por ejemplo, un dominio de enlace CD21 simple y un dominio de enlace CD79b simple, la invención comprende mezclas de las moléculas de enlace multivalentes que permitirán ajustar las concentraciones relativas de dominios de enlace para lograr un efecto deseado, como un efecto inhibitorio, acumulativo o

sinérgico. Es más, los métodos de la invención abarcan el uso de una molécula de enlace multivalente simple combinada con otra molécula de enlace, como una molécula de anticuerpo convencional, para ajustar u optimizar las concentraciones relativas los dominios de enlace. Los expertos en el arte podrán determinar las concentraciones relativas útiles de los dominios de enlace usando las técnicas ordinarias (por ejemplo, al diseñar matrices experimentales de dos series de dilución, una para cada dominio de enlace).

Sin pretender estar limitados por una teoría, se reconoce que el enlace de un ligando puede inducir o modular el aspecto superficial de un segundo ligando sobre el mismo tipo de célula, o puede alterar el contexto de la superficie del segundo ligando, de manera de alterar su sensibilidad al enlace por una molécula de enlace específica, tal como un anticuerpo o un anticuerpo o una molécula de enlace multivalente.

Aunque se ejemplifica aquí usando las líneas de linfocitos B y antígenos, estos métodos para determinar óptimamente las moléculas de enlace multivalentes (es decir, los escorpiones) son aplicables a otros entornos de enfermedades y poblaciones de células diana, incluidas otras células normales, sus contrapartes de células aberrantes, incluidas las células hematopoyéticas crónicamente estimuladas, las células de carcinoma y las células infectadas.

Otros fenotipos de señalización como la movilización de Ca^{2+}; la fosforegulación de tirosina; la activación de caspasa; la activación de NF-κB; citocina, elaboración del factor de crecimiento o quimioquina; o expresión génica (por ejemplo, en los sistemas de reporteros) son también susceptibles de ser utilizados en los métodos de tamizaje para determinar los efectos directos de las combinaciones de anticuerpos monoclonales.

Como alternativa al uso de un anticuerpo secundario para reticular los anticuerpos primarios e imitar la estructura de la molécula de enlace multivalente o del escorpión, otras moléculas que unen la porción Fc de los anticuerpos, incluidos los

receptores solubles de Fc, la proteína A, los componentes del complemento incluso C1q, lectina de enlace con manosa, las perlas o las matrices que contienen reactivo o los agentes de reticulación, los agentes de reticulación química bifuncionales y la adsorción al plástico, podrían usarse para reticular los anticuerpos monoclonales múltiples contra el mismo o diferentes antígenos.

Ejemplo 12

Estructuras de la proteína de enlace multivalente con función efectora, o escorpión

La estructura general de un polipéptido de escorpión es H2N-dominio de enlace 1-ligador de escorpión-subregión constante-dominio de enlace 2. Los escorpiones también pueden tener una región similar a bisagra, de manera característica una región de péptido derivada de una bisagra del anticuerpo, dispuesta en la posición N terminal respecto del dominio de enlace 1. En algunas formas de realización de escorpiones, el dominio de enlace 1 y el dominio de enlace 2 derivan de un dominio de enlace a la inmunoglobulina, por ejemplo derivados de un VL y un VH. Típicamente, los VL y VH están unidos por un ligador. Se han realizado experimentos para demostrar que los polipéptidos de escorpión pueden tener dominios de enlace que se diferencian de un dominio de enlace a la inmunoglobulina, incluido un dominio de enlace con la Ig del cual deriva el dominio de enlace de escorpión, por las diferencias de la secuencia de aminoácidos que dan lugar a una divergencia de la secuencia, típicamente, de menos del 5% y preferentemente de menos del 1%, en relación el dominio de enlace de Ig de origen.

Con frecuencia, las diferencias de la secuencia dan lugar a cambios de aminoácidos simples, como las sustituciones. Una ubicación preferida para tales cambios de aminoácidos es en una o más regiones de un dominio de enlace de escorpión que corresponden, o presentan al menos un 80% y preferentemente un 85% o un 90% de identidad de secuencia con una región determinante de

complementariedad (CDR) de la Ig de un dominio de enlace de la Ig del cual deriva el dominio de enlace de escorpión. Se proporciona orientación adicional al comparar los modelos de los péptidos que se enlazan a la misma diana, como CD20. En lo que se refiere a CD20, el mapeo de epítopos ha revelado que el anticuerpo 2H7, que se enlaza a CD20, reconoce el motivo Ala-Asn-Pro-Ser (ANPS) de CD20 y se espera que los escorpiones que se enlazan a CD20 también reconozcan este motivo. Se espera que los cambios de la secuencia de aminoácidos que dan lugar a que el motivo de ANPS que está profundamente enclavado en un bolsillo formado con las regiones del dominio de enlace de escorpión correspondientes a las CDR de la Ig sean ligadores funcionales de CD20. Los estudios de modelado también han revelado que las regiones de escorpión correspondientes a CDR3 (V_L), CDR1-3 (V_H) se ponen en contacto con CD20 y los cambios que mantienen o facilitan estos contactos producen los escorpiones que se enlazan a CD20.

Además de facilitar la interacción de un escorpión con su diana, se contemplan los cambios en las secuencias de los dominios de enlace de escorpión (en relación con secuencias del dominio de enlace Ig cognadas) que promueven la interacción entre las regiones del dominio de enlace de escorpión que corresponden para los dominios V_L y V_Hs de Ig. Por ejemplo, en una región de escorpión de enlace con la CD20 correspondiente a V_L, la secuencia de SYIV puede cambiarse al sustituir el aminoácido Val (V33), como His, dando lugar a la secuencia SYIH. Se espera que este cambio mejore la interacción entre las regiones de escorpión correspondientes a los dominios V_L y V_H. Aún más, se espera que el agregado de un residuo al extremo N terminal de una región de escorpiones correspondiente a V_H-CDR3 altere la orientación de esa región de escorpión, probablemente afectando sus características de enlace, porque la Ser del extremo N terminal de V_H-CDR3 hace contacto con CD20. Los análisis corrientes revelarán esas orientaciones que producen cambios aconsejables en las características de enlace. También se contempla que las mutaciones en las regiones

de escorpión correspondientes a V_H- CDR2 y/o V_H- CDR3 creen contactos nuevos potenciales con una diana, tal como CD20. Por ejemplo, basado en el modelado de los estudios, se espera que las sustituciones de cualquiera de Y105 y W106 (que se encuentran en la secuencia NSYW) en una región correspondiente a V_H-CDR3 alteren las características de enlace de un escorpión de una manera susceptible a los ensayos de rutina para identificar los escorpiones con características de enlace modificadas. A modo de ejemplo adicional, se espera que una alteración en la secuencia de un dominio de enlace de escorpiones correspondiente a un VL-CDR3 de Ig, como el Trp (W) en la secuencia CQQW afecte el enlace. De manera característica, las alteraciones en una región de escorpión correspondiente a una CDR de Ig se someterán a tamizaje para determinar aquellos escorpiones que presentan un aumento de la afinidad por la diana.

Basado en el modelo de estructura del dominio de enlace scFv a CD20 humanizado 20-4, en la información publicada respecto de la estructura en bucle extracelular de CD20 (Du, y colaboradores, *J Biol. Chem.* 282(20):15073-80 (2007)), y en el epítopo de enlace CD20 reconocido por el anticuerpo 2H7 de ratón (que fue la fuente de las CDR para el dominio de enlace scFv humanizado 20-4), se diseñaron mutaciones en las regiones CDR del escorpión 2Lm20-4x2Lm20-4 con la intención de mejorar la afinidad de su enlace a CD20. Primero, las mutaciones fueron diseñadas para influir en la conformación de 20-4 CDR y para promover un enlace más eficaz al bucle extracelular CD20. Segundo, los cambios introducidos estaban diseñados para proporcionar nuevas interacciones intermoleculares entre el escorpión 2Lm20-4x2Lm20-4 y su diana. Estas mutaciones incluyen: VL CDR1 V33H, es decir una sustitución de His por Val en la posición 33 de la CDR1 de la región VL), VL CDR3 W90Y, VH CDR2 D57E, VH CDR3 inserción de V después del residuo S99, VH CDR3 Y101K, VH CDR3 N103G, VH CDR3 N104G y VH CDR3 Y105D. Debido a los efectos sinérgicos previstos en cuanto a la combinación de algunas de estas mutaciones, se diseñaron 11 mutantes, combinando diferentes mutaciones como se muestra en la

237

Tabla 9 (los residuos introducidos mediante mutación se presentan en negritas y subrayados).

Tabla 9

V_L CDR1	**V_L CDR3**	**V_H CDR2**	**V_H CDR3**
RASSSVSYI **H**	QQWSFNPPT	AIYPGNGDTSYNQKFKG	**SV**YYSNYWYFDL
RASSSVSYI **H**	QQWSFNPPT	AIYPGNGDTSYNQKFKG	**SV**YY**GG**YWYFDL
RASSSVSYI **H**	QQWSFNPPT	AIYPGNGDTSYNQKFKG	SYYSNS**D**WYFDL
RASSSVSYI **H**	QQWSFNPPT	AIYPGNGDTSYNQKFKG	SYYS**GGD**WYFDL
RASSSVSYI V	QQWSFNPPT	AIYPGNGDTSYNQKFKG	SY**K**SNSYWYFDL
RASSSVSYI V	QQWSFNPPT	AIYPGNG**E**TSYNQKFKG	SYYSNSYWYFDL
RASSSVSYI V	QQ**Y**SFNPPT	AIYPGNGDTSYNQKFKG	SYYSNSYWYFDL
RASSSVSYI **H**	QQWSFNPPT	AIYPGNGDTSYNQKFKG	SY**K**SNS**D**WYFDL
RASSSVSYI **H**	QQWSFNPPT	AIYPGNG**E**TSYNQKFKG	SYYSNS**D**WYFDL
RASSSVSYI **H**	QQ**Y**SFNPPT	AIYPGNGDTSYNQKFKG	SYYSNS**D**WYFDL

RASSSVSYI **H**	QQ**Y**SFNPPT	AIYPGNG**E**TSYNQKFKG	SY**K**S**GGD**WYFD L

Se introdujeron mutaciones en los dominios de enlace de CD20xCD20 de escorpión (2Lm20-4x2Lm20-4) utilizando mutagénesis por PCR con los cebadores que codifican la región alterada de la secuencia. Después de la confirmación de secuencias, los fragmentos de ADN que codifican los fragmentos scFv 2Lm20-4 con correspondientes mutaciones se clonaron en un vector de expresión convencional que contiene una región de codificación para la subregión constante de un escorpión, lo que resulta en un polinucleótido que contiene la secuencia de ADN completa de las nuevas versiones del escorpión 2Lm20-4x2Lm20-4. Las variantes del escorpión 2Lm20-4x2Lm20-4 con mutaciones en la CDR fueron producidas por expresión en un sistema de células COS transitorias y purificadas a través de la Proteína A y la cromatografía por exclusión de tamaño (SEC). Las propiedades de enlace de las variantes de escorpión 2Lm20-4x2Lm20-4 se evaluaron mediante el análisis de FACS usando los linfocitos B primarios y la línea celular WIL2-S B-linfoma.

También se han generado otros mutantes usando un enfoque similar para optimizar los dominios de enlace a CD20. El CD20 SMIP designado TRU015 se usó como sustrato para generar mutantes y, a menos que se observe lo contrario, todos los dominios fueron dominios humanos. Se encontró que los siguientes mutantes contenían dominios de enlace CD20 útiles y funcionales. La molécula 018008 contenía una sustitución de Q (código de aminoácido de una letra) por S en la posición 27 de la CDR1 en VL, una sustitución de S por T en la posición 28 de la CDR1 de VH y una sustitución de L por V en la posición 102 de la CDR3 de VH. Las siguientes secuencias ligadoras de escorpión parciales, correspondientes a la secuencia de CCCP en una bisagra de IgG1, se combinaron por separado con VL y VH mutados: CSCS, SCCS y SCCP, coincidentes con los escorpiones de diseño modular. La molécula 018009

contenía una sustitución de Q por S en la posición 27 de la CDR1 de VL, una sustitución de S por T en la posición 28 de la CDR1 de VH y las sustituciones de S por V en la posición 96, L por V en la posición 102 y la supresión de V en la posición 95, todos en la CDR3 de VH. Las mismas subsecuencias ligadoras de escorpión que, según se describió, se encontraban en los ligadores de escorpión usados en 018008, se usaron en 018009. La molécula 018010 contenía sustituciones de un Q por S en la posición 27, un I por M en la posición 33 y un V por H en la posición 34, todos en la CDR1 de VL, junto con un S por la sustitución de T en la posición 28 de la CDR1 de VH y un L por sustitución V a la posición 102 de la CDR3 de VH. Los ligadores de escorpión definidos por las subsecuencias CSCS y SCCS se usaron con 018010. 018011 contenía las mismas mutaciones en la CDR1 de VL y en la CDR1 de VH según se describe para 018010, junto con la supresión de V en la posición 95, la sustitución de S por V en la posición 96 y la sustitución de L por V en la posición 102, todos en la CDR3 de VH. Los ligadores de escorpión definidos por las subsecuencias CSCS, SCCS y SCCP se usaron con las moléculas 018010. La molécula 018014 VL era un VL de ratón no-mutado, con un VH humano que contenía el cambio de S por T en la posición 28 de la CDR1 y el cambio L por V en la posición 102 de la CDR3. 018015 también contenía un VL de ratón no mutado junto con un VH humano que contenía un cambio de S por T en la posición 28 de la CDR1 y, en la CDR3, una supresión de V en la posición 95, la sustitución de S por V en la posición 96 y la sustitución de L por V en la posición 102. La molécula 2Lm5 tenía una sustitución Q por S en la posición 27 de la CDR1 de VL, y una sustitución F por Y en la posición 27 y una sustitución S por T en la posición 30, ambas en la CDR1 del VH, al igual que la eliminación de V en la posición 95, sustitución de S por V en la posición 96 y de L por V en la posición 102, en todos los casos en la CDR3 del VH. Los ligadores de escorpión definidos por las CSCS, SCCS y SCCP se usaron por separado en cada una de 018014 y 018015. 2Lm5-1 fue igual que 2Lm5, excepto que 2Lm5-1 no tuvo ninguna mutación en la CDR1 de VH, y sólo se

usó un ligador de escorpión definido por la subsecuencia de CSSS. 2Lm6-1 tenía las mutaciones de 2Lm5 y una sustitución de T por S en la posición 92 y S por F en la posición 93 de la CDR3 del VL, y sólo se usó el ligador de escorpión definido por la subsecuencia CSSS. Las únicas mutaciones en 2Lm16 fueron las mutaciones en la CDR3 del VH enumeradas más arriba para 2Lm5-1. Los ligadores de escorpión definidos por las subsecuencias CSCS, SCCS y SCCP se usaron en forma independiente en 2Lm16. 2Lm16-1 sustituyó Q por S en la posición 27 en la CDR1 del VL y sustituyó T por S en la posición 92, y S por F en la posición 93, tanto en la CDR3 del VL como en la CDR3 del VH, eliminó V en la posición 95, sustituyó S por V en la posición 96 y sustituyó L por V en la posición 102; sólo se usó el ligador de escorpión definido por la subsecuencia de CSSS. 2Lm19-3 sustituyó Q por S en la posición 27, I por M en la posición 33 y V por H en la posición 34, todas en la CDR1 del VL, junto con las mutaciones en la CDR3 del VH enumeradas para 2Lm16-1. Los ligadores de escorpión definidos por las subsecuencias CSCS, SCCS y SCCP se usaron en forma independiente en 2Lm19-3. La molécula 2Lm20-4 contenía una sustitución de I por M en la posición 33 y de V por H en la posición 34, ambas en la CDR1 de VL, junto con las mutaciones en la CDR3 del VH enumerada para 2Lm16-1. Para 2Lm5-1, 2Lm6-1, 2Lm16, 2Lm16-1, 2Lm19-3 y 2Lm20-4 también se sustituyó S por L en la posición 11 de la región de entramado del VH. Los ligadores de escorpión definidos por las subsecuencias CSCS, SCCS y SCCP se usaron en forma independiente en la molécula 2Lm20-4. Finalmente, la sustitución de S por P en la posición 331 estaba presente en los siguientes mutantes: 018008 con el ligador de escorpión definido por CSCS; 018009 con cada uno de los ligadores de escorpión definidos por CSCS y SCCP; 018010 con el ligador de escorpión definido por CSCS; 018011 con el ligador de escorpión definido por SCCP; 018014 con el ligador de escorpión definido por CSCS; 018015 con el ligador de escorpión definido por CSCS, 2Lm16 con ligadores de escorpión definidos por cualquiera de CSCS, SCCS y SCCP; 2Lm19-3 con un ligador

de escorpión definido por CSCS o SCCP; y 2Lm20-4 con un ligador de escorpión definido por CSCS o SCCP.

Además, se contemplan los cambios en la longitud de un ligador que unía dos regiones de un dominio de enlace, como las regiones de un dominio de enlace de escorpión que corresponden a un Ig V_L y V_H. Por ejemplo, se prevé que la remoción de un Asp C terminal en los ligadores del interdominio donde se encuentra, afecte las características de enlace de un escorpión, como es una sustitución de Gly por Asp.

También se contemplan los escorpiones que tienen un ligador de escorpión (C terminal interpuesto en la subregión constante y N terminal en el dominio de enlace 2), que se alarga en relación con una región de bisagra de una Ig, y se agregan residuos de aminoácidos en el extremo C terminal en cualquier cisteína en el escorpión que corresponde a una cisteína de la bisagra de la Ig, con la cisteína de escorpión que es capaz de formar un enlace de disulfuro intercatenario. Se han construido y se caracterizan a continuación los escorpiones que contienen estas propiedades.

Se emprendieron esfuerzos para mejorar la expresión, la estabilidad y la potencia terapéutica de los escorpiones mediante la optimización del ligador de escorpión que une covalentemente la subregión constante y el dominio de enlace 2 dispuesto en el extremo C terminal. El escorpión prototípico usado para estudios de optimización contenía un scFV anti-CD20 (dominio de enlace 1) fusionado en el extremo N terminal con la subregión constante derivada de C_{H2} y C_{H3} de la IgG1, con un segundo scFv anti-CD20 fusionado en el extremo C terminal con esa subregión constante. Se espera que este escorpión, como las moléculas de inmunoglobulina, se asocie mediante la región (o subregión) constante para formar un complejo homodimérico con cadenas de péptidos vinculadas por los enlaces de disulfuro. Para obtener un nivel alto de expresión de una molécula tetravalente estable con afinidad alta para su diana CD20, el ligador de escorpión entre la subregión constante y el segundo dominio de enlace de adecuarse a las siguientes consideraciones. Primero, el impedimento estérico entre los

242.

dominios de enlace homólogos llevados por los dos fragmentos scFv (un fragmento scFv en cada uno de dos monómeros de escorpión) debe reducirse al mínimo para facilitar el mantenimiento de las conformaciones nativas de cada dominio de enlace. Segundo, las configuraciones y las orientaciones de los dominios de enlace deben permitir la asociación productiva de los dominios y el enlace de afinidad alta de cada dominio de enlace a su diana. Tercero, el ligador de escorpión propiamente dicho debe ser relativamente resistente a proteasa y no-inmunógeno.

En la construcción CD20xCD20 de escorpión S0129 de ejemplo, el extremo C terminal de C_{H3} y el segundo dominio scFV anti-CD20 fueron enlazados por el ligador de escorpión 2H7, un péptido derivado de -y correspondiente a- un fragmento de una secuencia de bisagra humana natural de la IgG1. El ligador de escorpión 2H7 sirvió como base para los esfuerzos de diseño usando el modelado asistido por computadora que tuvo como finalidad mejorar la expresión de los escorpiones y mejorar las características de enlace de las moléculas expresadas.

Para analizar el ligador de escorpión 2H7, la estructura tridimensional de una forma dimérica de la bisagra de IgG1 del ser humano se modeló usando el software Insight II. La estructura de cristal del scFV anti-CD20 en la orientación V_H-V_L se eligió como una estructura de referencia para los 20-4 dominios de enlace (código de entrada de Bancos de Datos Proteicos de RCSB: 1A14). En la IgG1 intacta, la bisagra conecta el extremo C terminal del dominio C_{H1} al extremo N terminal del dominio C_{H2}, con la configuración de cada dominio que es de tal manera que los residuos cisteína de la bisagra pueden emparejarse para formar un homodímero. En la molécula de escorpión de ejemplo, el ligador 2H7 derivado de bisagra se conectó con el extremo C terminal del dominio de escorpiones derivado del dominio C_{H3} de la IgG1 en el extremo N terminal de esa porción del dominio de enlace de escorpión 2 derivado de un dominio V_{H2} de la IgG1. Usando una estructura modelada 3-D de scFV V_H- V_L, las expectativas de la distancia óptima entre los extremos C terminales de los ligadores 2H7 se vieron

influenciadas por tres consideraciones. Primero, la estabilidad de la bisagra debe mantenerse, y la estabilidad es ayudada por dimerización, por ejemplo, homodimerización, que significa que las cisteínas de la bisagra deben poder emparejarse en presencia de los dos dominios de enlace plegados. Segundo, dos dominios de enlace, por ejemplo, scFVs, deben acomodar los extremos C terminales del ligador 2H7 sin impedimento estérico para permitir el adecuado plegado proteico. Tercero, las CDR de cada dominio de enlace deben poder mirar en la misma dirección, como en un anticuerpo nativo, porque cada dominio de enlace del escorpión prototípico puede unir los receptores adyacentes (CD20) en la misma superficie celular. En virtud de estas consideraciones, se espera que la distancia entre los dos extremos N terminales de los scFvs sea de aproximadamente 28Å. Se espera que la distancia entre los extremos C terminales de los ligadores 2H7 diseñados teóricamente en las formas de escorpiones diméricas sea de 16Å, aproximadamente. Para acomodar las distancias que se necesiten para optimizar el desempeño de un escorpión, el extremo C terminal del ligador 2H7 se extendió en 3 aminoácidos, como mínimo. Se espera que tal extensión permita la formación de los enlaces disulfuro entre los residuos cisteína del ligador 2H7, para permitir el adecuado plegado del dominio de enlace del extremo C terminal 2 y para facilitar una orientación correcta de las CDRs. .Además, una IgG1 intacta, debido a la presencia de los dominios C_{H1} y V_{L1} entre la bisagra y los dominios de enlace, la distancia entre los dominios de enlace llevados por las dos cadenas aumenta aún más y se prevé que favorezca adicionalmente la reticulación de los receptores adyacentes en la misma superficie celular. En vista de las consideraciones descriptas previamente, se diseñó un conjunto de ligadores con diferentes longitudes (Tabla 10) Para reducir al mínimo la inmunogenicidad, los residuos naturales presentes en el extremo N terminal del dominio C_{H2} (Ala-Pro-Glu-Leu o APEL) se usaron para alargar el ligador de escorpión 2H7 mediante el agregado de secuencias al extremo C terminal del ligador de escorpión. Las construcciones más largas contenían una o

24A

múltiples unidades ligadoras (Gly4Ser) conocidas ser resistentes a la proteasa y flexibles.

Las construcciones de escorpiones CD20xCD20 que contenían ligadores prolongados de escorpión entre el dominio C_{H3} de la subregión constante y el dominio de enlace scFv del extremo C terminal se construyeron usando mutagénesis de PCR y se subclonaron en un vector de expresión de mamífero convencional. El efecto de la longitud del ligador en la expresión de CD20xCD20 de escorpión podría analizarse por comparación con el rendimiento de la proteína secretada en los experimentos de expresión transitoria usando COS o las células HEK293, o mediante el análisis de la síntesis proteica y la acumulación en las células por los análisis de transferencia de Western o los estudios de pulsado y seguimiento con [35]S-metionina/cisteína marcada

Tabla 10

Número de construcción	**Secuencia ligadora central (2H7) de escorpión**	**Secuencia de extensión**	**Secuencia del ligador de escorpión extendida**
1	GCPPCPNS	APEL	GCPPCPNSAPEL
2	GCPPCPNS	APELGGGGS	GCPPCPNSAPELGGGGS
3	GCPPCPNS	APELGGGGSGGGGS	GCPPCPNSAPELGGGGSGGGGS
4	GCPPCPN	APELGGGGSGGGGSGGG	GCPPCPNS

	S	GS	APELGGGGSG GGGSGGGGS

También se contemplan los escorpiones glicosilados y, en este contexto, se prevé que las células hospedantes que expresan un escorpión se cultiven en la presencia de un modificador de carbohidratos, que se define en la presente como un compuesto orgánico presente, preferentemente de peso molecular menor que 1000 daltons, que inhibe la actividad de una enzima involucrada en el agregado, eliminación o modificación de azúcares que son parte de un carbohidrato unido a un polipéptido, tal como sucede durante la maduración del carbohidrato con enlace N de una proteína. La glicosilación es un complejo proceso que tiene lugar en el retículo endoplásmico ("glicosilación central"), y en los cuerpos de Golgi ("glicosilación terminal"). Una variedad de inhibidores de glicosidasa y/o manosidasa proveen uno o más de los efectos convenientes de aumentar la actividad de ADCC, incrementar el enlace del receptor Fc y alterar el patrón de glicosilación. Los ejemplos de inhibidores incluyen, sin limitación, castanospermina y quifunensina. Los efectos de expresar escorpiones en la presencia de, al menos, uno de dichos inhibidores se revelan en el siguiente ejemplo.

Ejemplo 13

Niveles de expresión de la proteína de escorpión y caracterización

Se determinaron los niveles de expresión las proteínas de escorpión y las proteínas expresadas se caracterizaron para demostrar que el diseño proteico produjo productos que tenían beneficios prácticos. Una CD20xCD20 de escorpión monoespecífica y una CD20xCD37 de escorpión biespecífico se expresaron en células CHO DG44 en el cultivo usando las técnicas convencionales.

La expresión estable de nivel basal CD20xCD20 de escorpión S0129 (2Im20-4x2Im20-4) en células CHO DG44 cultivadas en la presencia de varios suplementos de

alimentos balanceados se observó en la Figura 34. Todos los medios cultivados contenían 50 nM de metotrexato, una concentración que mantuvo el número de copias del polinucleótido codificante de escorpión. El polinucleótido contenía una región codificante para la proteína de escorpión que no estaba optimizada por codón para la expresión de células CHO DG44. El polinucleótido se introdujo en las células usando el vector de pD18. Como se observa en la Figura 34, se obtuvieron niveles expresión de 7-46 µg/ml, aproximadamente.

También se determinaron los niveles de expresión posteriores a la amplificación del polinucleótido que codifica una CD20xCD37 de escorpión biespecífico. El vector pD18 se usó para clonar la región de codificante de CD20xCD37 de escorpión, y el plásmido se introdujo en células CHO DG44. La amplificación del polinucleótido de codificación se logró usando la técnica de metotrexato *dhfr-* conocida en el arte, donde se usan mayores concentraciones del MTX para seleccionar un mayor número de copia del gen de dihidrofolato reductasa (*dhfr*), el cual conduce a la co-amplificación del polinucleótido de interés firmemente enlazado. La Figura 35 muestra que, típicamente, se observaron niveles de expresión estable de aproximadamente 22 a 118 µg/ml de CD20xCD37 de escorpión. Se apreció variabilidad en el rendimiento en diferentes condiciones, incluida la concentración de metotrexato usada para la amplificación, pero estas variables pueden ser optimizadas por el experto en el arte. Una variedad de otras moléculas de escorpión descriptas aquí también se sometió a los análisis de expresión en células CHO y/o COS, con los resultados proporcionados en la Tabla 11. Estos resultados demuestran que pueden obtenerse rendimientos significativos de las proteínas de escorpión usando las técnicas convencionales y la técnica de optimización corriente de la amplificación.

Las proteínas expresadas también se caracterizaron por el análisis de SDS-PAGE para evaluar los grados de homogeneidad y la integridad de las proteínas expresadas, y para confirmar el peso molecular de los péptidos monoméricos. Los

geles desnaturalizantes de poliacrilamida (4-20% Tris Glicina) se corrieron en condiciones reductoras y no-reductoras. Los resultados presentados en la Figuran 36 revelan bandas proteicas simples para cada uno de 2Lm20-4 SC SMIP y S1000 (CD20(2lm20-4)xCD20(2lm20-4) monoespecífico de escorpión, S0126) de los pesos moleculares monoméricos bajo condiciones reductoras. Estos datos establecen que los SMIPs y los escorpiones son susceptibles de la purificación en una forma intacta. En condiciones no-reductoras, se aprecian trazas de un péptido compatible con el tamaño esperado de un SMIP monomérico, y la gran mayoría de la proteína aparecía en una única banda bien definida compatible con una estructura dimérica. En estas condiciones no-reductoras, la proteína de escorpión monoespecífico demostró una banda simple bien definida de peso molecular consistente con una estructura dimérica. Las estructuras diméricas tanto para el SMIP como para el escorpión son compatibles con sus estructuras monoméricas, cada una de los cuales contiene un ligador de escorpión similar a bisagra que tiene al menos una cisteína capaz de participar en la formación de enlaces de disulfuro.

También se evaluó el efecto de los ligadores de escorpión sobre la expresión e integridad de los escorpiones, y los resultados se muestran en la Tabla 12. Esta tabla enumera las variantes de ligadores de escorpión de CD20xCD20 (2Lm20-4x2Lm20-4) S0129 de escorpión monoespecífico y la CD20xCD28 de escorpión S0033 (2H7sccpIgG1-H7-2e12), su integridad como moléculas monocatenarias, y sus niveles de expresión transitoria en las células COS en relación con el escorpión madre S0129 o S0033, según convenga, con un ligador H7 (que se fija en el 100%). La Tabla 13 proporciona datos que son resultado de una evaluación de las variantes ligadoras de escorpiones incorporadas en la CD20xCD20 de escorpión, junto con los datos análogos para la CD20xCD28 de escorpión. La Tabla 13 proporciona datos que son resultado de una evaluación de las variantes S0129 que contenían ligadores de escorpión que no son ligadores similares a bisagra que contienen al menos una cisteína capaz de formar

enlaces disulfuro; en cambio, los ligadores de escorpión en estas moléculas se derivan de los tallos de C-lectina de tipo II. De los datos presentados en la Tabla 13 surge que los ligadores de escorpión similares a bisagra pueden asociarse con escorpiones expresados en mayores o menores niveles que un ligador de escorpión madre no-modificado en ensayos de expresión transitorios. Aún más, algunas de las variantes ligadoras presentan mayor resistencia al clivado proteolítico que el ligador madre no-modificado, una inquietud para todas o casi todas las proteínas expresadas. Los datos de la Tabla 13 indican que los ligadores no-similares a bisagra como los ligadores derivados de la región de tallo de C-lectinas de tipo II se encuentran en los escorpiones que exhiben características de enlace que varían levemente de los escorpiones que contenían ligadores de escorpión similares a bisagra. Además, el escorpión que contenía un ligador de escorpión no-similar a bisagra presenta la función efectora (ADCC) que equivale o excede la ADCC asociada con escorpiones que tienen ligadores de escorpión similares a bisagra.

Tabla 11

Nombre del ligador	Secuencia aguas arriba (CH3)	Variantes del ligador S0129 (2Lm20-4 x 2Lm20-4) - aa seq[1]	Basada en	AAs	Expresión en COS[2]	Clivado[3]	Expresión en CHO[2]
Name	Sequence	linker variants - aa seq[1]	based on	#AAs	COS[2]	Cleavage[3]	CHO[2]
H7	QKSLSLSPGK	GCPPCPNS	H7	16	100	-	100
H16	QKSLSLSPGK	ILSVKADFLTPSIGNS	CD80	25	174	+	
H18	QKSLSLSPGK	ILSVLANFSQPEIGNS	CD86	25	165	++	
H19	QKSLSLSPGK	LSVLANFSQPEISCPPCPNS	CD86 + H7	30	161	+	109
H26	QKSLSLSPGK	RIHQMNSELSVLANS	CD86	25	170	++	
H32	QKSLSLSPGK	RIHLNVSERPFPPNS	CD22	25	184	++	
H47	QKSLSLSPG	LSVKADFLTPSIGNS	H16	24	141	-	200
H48	QKSLSLSPG	KADFLTPSIGNS	H16	21	137	-	
H50	Q	LSVLANFSQPEIGNS	H18	15	21	-	
H51	QKS	LSVLANFSQPEIGNS	H18	18	110	-	
H52	QKSLSLSPG	SQPEIVPISNS	H18	20	95	-	
H53	QKSLSL	SQPEIVPISCPPCPNS	H19	26	96	-	
H54	Q	SVLANFSQPEISCPPCPNS	H19	21	72	+/-	
H55	QKSLSLSPG	RIHQMNSELSVLANS	H26	24	113	+	
H56	QKSLSLSPG	QMNSELSVLANS	H26	21	130	-	163
H57	QKSLSLSPG	IVSERPFPPNS	H32	19	118	-	
H58	QKSLSLSPG	KPFFTCGSADTCPNS	CD72	24	103	-	
H59	QKSLS	KPFFTCGSADTCPNS	CD72	20	84	-	

[1] NFS es un motivo de consenso de glicosilación

[2] Expresión transitoria en COS (placas 6W) o CHO (matraz simple) respecto de SO129-H7 (%)

[3] Productos del clivado observados por SOS-PAGE/tinción de plata: - = ninguno; + = banda débil; ++ = bandas principales; +++>50% clivado

Tabla 12

Nombre del ligador	**Variantes del ligador S0129 (2Lm20-4 x 2Lm20-4) - aa seq**	**Cambios en CH3[1]**	**Secuencia del ligador basada en**	**Expresión 20x20[2]**	**Clivado de 20x20[3]**
H7	GCPPCPNS	N	H7	100	-
H8	GSPPSPNS	N	H7	107	+
H9	GSPPSPNS	Y	H7	142	-
H10	EPKSTDKTHTCPPCPNS	N	IgG1 hinge	98	-
H11	EPKSTDKTHTSPPSPNS	N	IgG1 hinge	126	+
H16	LSVKADFLTPSIGNS	N	CD80	174	+
H17	LSVKADFLTPSISCPPCPNS	N	CD80 + H7	113	+
H18	LSVLANFSQPEIGNS	N	CD86	165	++
H19	LSVLANFSQPEISCPPCPNS	N	CD86 + H7	161	+
H20	LKIQERVSKPKISNS	N	CD2	115	+++
H21	LKIQERVSKPKISCPPCPNS	N	CD2 + H7	90	+++
H22	LNVSERPFPPHIQNS	N	CD22	149	++
H23	LDVSERPFPPHIQSCPPCPNS	N	CD22 + H7	121	++

Nombre del ligador	**Variantes del ligador S0129 (2Lm20-4 x 2Lm20-4) - aa seq**	**Cambios en CH3[1]**	**Secuencia del ligador basada en**	**Expresión 20x20[2]**	**Clivado de 20x20[3]**
H24	REQLAEVTLSLKANS	N	CD80	145	++
H25	REQLAEVTLSLKACPP CPNS	N	CD80 + H7	98	+
H26	RIHQMNSELSVLANS	N	CD86	170	++
H27	RIHQMNSELSVLACPP CPNS	N	CD86 + H7	154	++
H28	DTKGKNVLEKIFSNS	N	CD2	153	+
H30	LPPETQESQEVTLNS	N	CD22	78	+
H32	RIHLNVSERPFPPNS	N	CD22	184	++
H33	RIHLNVSERPFPPCPP CPNS	N	CD22 + H7	74	+
H36	GCPPCPGGGGSNS	N	H7	110	+
H40	GCPPCPANS	Y	H7	110	+
H41	GCPPCPANS	Y	H7	102	-
H42	GCPPCPNS	Y	H7	99	-
H44	GGGASCPPCPGNS	Y	H7	108	+
H45	GGGASCPPCAGNS	Y	H7	107	-
H46	GGGASCPPCANS	Y	H7	98	-
H47	LSVKADFLTPSIGNS	Y	CD80	141	-

Nombre del ligador	**Variantes del ligador S0129 (2Lm20-4 x 2Lm20-4) - aa seq**	**Cambios en CH3[1]**	**Secuencia del ligador basada en**	**Expresión 20x20[2]**	**Clivado de 20x20[3]**
H48	ADFLTPSIGNS	N	CD80	137	-
H50	LSVLANFSQPEIGNS	Y	CD86	21	-
H51	LSVLANFSQPEIGNS	Y	CD86	110	-
H52	SQPEIVPISNS	Y	CD86	95	-
H53	SQPEIVPISCPPCPNS	Y	CD86 + H7	95	-
H54	SVLANFSQPEISCPPCPNS	Y	CD86 + H7	72	+/-
H55	RIHQMNSELSVLANS	Y	CD86	118	+
H56	QMNSELSVLANS	Y	CD86	130	-
H57	VSERPFPPNS	Y	CD22	118	-
H58	KPFFTCGSADTCPNS	Y	CD72	103	-
H59	KPFFTCGSADTCPNS	Y	CD72	94	-
H60	QYNCPGQYTFSMNS	Y	CD69	>100[5]	-
H61	EPAFTPGPNIELQKDSDCNS	Y	CD94	>100	-
H62	QRHNNSSLNTRTQKARHCNS	Y	NKG2A	>100	-
H63	NSLFNQEVQIPLTESYC	Y	NKG2D	>100	-

Nombre del ligador	**Variantes del ligador S0129 (2Lm20-4 x 2Lm20-4) - aa seq**	**Cambios en CH3[1]**	**Secuencia del ligador basada en**	**Expresión 20x20[2]**	**Clivado de 20x20[3]**
	NS				

[1]Cambios adicionales al extremo de CH3, tal como la eliminación y/u optimización de codón 1-9 aa

[2]Expresión transitoria en COS (placas 6W), respecto de S0129-H7 madre (%)

[3]Productos del clivado observados por SDS-PAGE/tinción de plata:

-=ninguno, +=banda débil, ++=bandas principales, +++>50% de clivado

[5] Varianes H60-H63 comparadas por estimación del recupero de proteínas purificadas de medio COS agotado

Tabla 13

Proteínas	**Descripción**	**Rendimiento de la producción (ug de proteína purificada/ml sup**	**% de POI (Peso molecular en Kd por MALS)**	**Mejora respecto del peso S0129 POI**	**Enlace a Ramos**	**Ensayo ADCC**	**Secuencia del ligador de escorpión**
S0129wt	ligador H7	1,6	67 (167)	-	-	-	GCPPC
S0129-CD69	tallo CD69	2,9	66 (167)	1,8	Más débil que el peso de S0129	*Ligeramente mejor que el peso de SOI129 POI	QYNCPGQYTFSM
S0129-CD72	Tallo truncado CD72	2,0	69 (165)	1,2	Similar al peso de S0129	*Ligeramente mejor que el	PFFTCGSADTC

						peso de SOI129 POI	
S0129-CD94	Tallo CD94	2,9	67 (171)	1,8	Similar al peso de S0129	*Ligeramente mejor que el peso de SOI129 POI	EPAFTPGPNIELQKDSDC
S0129-NKG2A	Tallo NKG2A	2,5	93 (170)	2,2	*Ligeramente mejor que el peso de SOI129	Similar al peso de S0129 POI	QRHNNSSLNTRTQKARHC
S0129-NKG2D	Tallo NKG2D	1,9	70 (166)	1,2	Similar al peso de S0129	*Ligeramente mejor que el peso de SOI129 POI	NSLFNQEVQIPLTESYC

Tal como se indica en el ejemplo precedente, se contempla la producción por expresión de escorpiones en cultivos que contienen un modificador de carbohidratos. En las formas de realización de ejemplo, se agrega castanospermina (peso molecular:

189,21) al medio de cultivo en una concentración final aproximada de 200 µM (correspondiente a, aproximadamente, 37,8 µg/mL), o rangos de concentraciones mayores que 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 o 150 µM, aproximadamente; y hasta 300, 275, 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 60 o 50 µg/mL, aproximadamente. Por ejemplo, se contemplan rangos de 10-50, o 50-200, o 50-300, o 100-300, o 150-250 µM. En otras formas de realización de ejemplo, se agrega DMJ, por ejemplo (peso molecular: 199,6), al medio de cultivo en una concentración final aproximada de 200 µM (correspondiente a, aproximadamente, 32,6 µg/mL), o rangos de concentraciones mayores que 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 o 150 µM, aproximadamente; y hasta 300, 275, 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 60 o 50 µg/mL, aproximadamente. Por ejemplo, se contemplan rangos de 10-50, o 50-200, o 50-300, o 100-300, o 150-250 µM. En las formas de realización de ejemplo, se agrega quifunensina (peso molecular: 232,2) al medio de cultivo en una concentración final aproximada de 10 µM (correspondiente a, aproximadamente, 2,3 µg/mL), o rangos de concentraciones mayores que 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 µM, aproximadamente; y hasta 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 u 11 µg/mL, aproximadamente. Por ejemplo, se contemplan rangos de 1-10, o 1-25, o 1-50, o 5-10, o 5-25, o 5-15 µM.

En un experimento, un CD20xCD20 de escorpión monoespecífico (S0129) se expresó en células cultivadas en 200 de µM castanospermina (S0129 CS200) o 10 µM (exceso) quifunensina (S0129 KF 10) y se midió el enlace o tinción de células WIL2S por el escorpión expresado, como se muestra en la Figura 42. En los estudios de enlace comparativos, por otro lado, un S0129 de escorpión se enlazó a CD16 (FCγRIII) aproximadamente tres veces mejor que el S0129 de escorpión no glicosilado.

En otro estudio, se exploró la destrucción mediada por ADCC de los linfocitos B BJAB por CD20xCD20 (S0129) de escorpión humanizada Los resultados mostrados en la Figura 43 establecen que el escorpión, cuando es expresado en las células que

están siendo cultivadas en presencia de castanospermina o quifunensina, derivó en la muerte de linfocitos B BJAB mediados por ADCC más potente para una concentración dada de la exposición de escorpiones.

Ejemplo 14

Enlace de escorpiones

a. Espaciamiento de dominios

Los escorpiones biespecíficos son capaces de enlazarse a, al menos, dos dianas simultáneamente, utilizando los pares de dominios de enlace en los extremos N y C terminales de la molécula. Así, para las dianas de la superficie celular, la composición puede reticular o causar la co-aproximación física de las dianas. Los expertos en el arte apreciarán que muchos sistemas receptores se activan sobre tal reticulación, dando lugar a la inducción señalada que causa cambios en el fenotipo celular. El diseño de las composiciones reveladas aquí se concibió, en parte, para maximizar tal señalación y controlar el fenotipo resultante.

Las dimensiones aproximadas de los dominios de las composiciones de escorpiones, así como las expectativas de flexibilidad interdominio en cuanto a rangos de ángulos del interdominio, se conocen y se consideraron al diseñar la arquitectura de escorpión. Para los escorpiones que usan los dominios de enlace scFv para los dominios de enlace 1 y 2 (BD1 y BD2), una bisagra en el extremo N terminal IgG1 (H1) y el ligador de H7 PIMS descripto aquí, el dominio de enlace en el extremo N terminal y el dominio de enlace en el dominio C terminal pueden estar separados, como máximo en 150-180Å, y como mínimo 20-30Å, aproximadamente. Los dominios de enlace en el extremo N terminal pueden estar separados, como máximo en 90-100Å, y como mínimo en 10-20Å, aproximadamente, (Deisenhofer, y colaboradores, 1976, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd.* 357, S. 435-445; Gregory, y colaboradores, 1987, *Mol. Immunol.* 24(8):821-9.; Poljak, y colaboradores, 1973, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1973, 70: 3305-

3310; Bongini, y colaboradores, 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 6466-6471; Kienberger, y colaboradores, 2004, *EMBO Reports*, 5: 579-583, que se incorporan íntegramente a la presente a modo de referencia). La elección de estas dimensiones se hizo en parte para permitir las distancias receptor-receptor menores que 50Å, aproximadamente, en los complejos receptores enlazados por el escorpión, ya que las distancias menores que éstas pueden ser óptimas para la señalización máxima de ciertos oligómeros receptores (Paar, y colaboradores, 2002, *J. Immunol.*, 169: 856-864, que se incorpora a la presente por referencia), mientras se permite la incorporación de las estructuras F_C requeridas para la función efectora.

Los dominios de enlace en los extremos N y C terminales de los escorpiones estaban diseñados como estructuras flexibles para facilitar el enlace de la diana, y para permitir un rango de geometrías de las dianas enlazadas. Los expertos en el arte también apreciarán que la flexibilidad entre los dominios de enlace del extremo N o C terminal (BD1 y BD2, respectivamente) y entre los dominios de enlace y el dominio F_C de la molécula, así como las distancias máximas y mínimas entre los receptores enlazados por BD1 y/o BD2, pueden modificarse, por ejemplo, por elección del dominio de bisagra del extremo N terminal (H1) y, por analogía estructural, el dominio del ligador de escorpión ubicado en el extremo C más terminal (H2). Por ejemplo los dominios de bisagra de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA2, las bisagras sintéticas y el dominio C_{H2} similar a bisagra de la IgM muestran diferentes grados de flexibilidad, así como diferentes longitudes. Los expertos en el arte entenderán que la elección óptima de H1 y el ligador de escorpión (H2) dependerá del sistema receptor con el cual el escorpión está diseñado para interactuar, así como el fenotipo deseado de señalización inducido por el enlace de escorpión.

En algunas formas de realización, los escorpiones tienen un ligador de escorpión (H2) que es un ligador similar a bisagra correspondiente a una bisagra de Ig, como una bisagra IgG1. Estas formas de realización incluyen escorpiones que tienen una

secuencia de aminoácidos de la bisagra de escorpión, que es una secuencia prolongada en el extremo N terminal en relación con, por ejemplo, la secuencia H7 o la secuencia de la bisagra de IgG1 de tipo silvestre. Los ligadores de escorpión de ejemplo de este tipo tendrían la secuencia de bisagra H7 con el extremo N terminal prolongado por H_2N-APEL$(x)_y$- CO_2H, donde x es una unidad del ligador Gly_4Ser y es un número entre 0 y 3. Para ejemplificar la influencia del ligador de escorpión sobre la estabilidad del escorpión se hace un estudio utilizando dos escorpiones: una CD20xCD28 de escorpión biespecífico y una CD20xCD20 de escorpión monoespecífico. Para cada uno de estos diseños de escorpión, se insertaron una variedad de ligadores de escorpión. En particular, los ligadores de escorpión H16 y H17, que principalmente difieren en que el H17 tiene la secuencia de H16 con la secuencia de H7 unida en el extremo C terminal, y los ligadores de escorpión H18 y 19 en que, de manera análoga, la secuencia H7 se une en el extremo C terminal de H18 para generar H19. Para cada una de los dos esqueletos de escorpiones (20x28 y 20x20), cada uno de los cuatro ligadores de escorpión anteriormente descriptos se insertó en la ubicación apropiada. La expresión transitoria de estas construcciones se obtuvo en las células COS y las proteínas de escorpión encontradas en el sobrenadante del cultivo se purificaron en pocillos recubiertos con A/G (kit Pierce SEIZE IP). Las proteínas purificadas se fraccionaron en geles SDS-PAGE y se visualizaron por tinción de plata. La inspección de la Figura 44 revela que la secuencia H7 adicional en el ligador de escorpión se agrega a la estabilidad de cada tipo de ligador de escorpión y cada tipo de proteína de escorpión. En otras palabras, la unión de H7 al extremo C terminal de H16 o H18 mejoró la estabilidad de la molécula de escorpión y esta observación se mantuvo independientemente de si el escorpión era CD20xCD28 o CD20xCD20. En cuanto al enlace de la diana, las proteínas de escorpión que tenían la arquitectura de CD20xCD20 presentaron propiedades de enlace similares a

CD20xCD20 de escorpión S0129 humanizada monoespecífica madre, como se muestra en la Figura 45.

Más allá de las precedentes formas de realización, sin embargo, quizá sea aconsejable impedir que los receptores enlazados se acerquen dentro de 50Å, aproximadamente, entre sí para crear señales intencionalmente submáximas (Paar, y colaboradores, *J. Immunol.*, 169: 856-864). En tal caso, se prevé que las elecciones de H1 y el ligador de escorpión (H2) que son más cortos y menos flexibles que aquellos descriptos anteriormente sean apropiados.

Las mismas consideraciones de espaciamiento se aplican a los ligadores de escorpión que no son similares a bisagra. Estos ligadores de escorpión son ejemplificados por la clase de péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de una región de tallo de una C-lectina. Las bisagras de escorpiones ejemplares que comprenden una región de tallo de C-lectina son las bisagras de escorpiones derivadas de la región del tallo CD72, la región de tallo CD94 y la región del tallo NKG2A. Los escorpiones que contienen tales bisagras de escorpiones se construyeron y se caracterizaron en cuanto a la expresión, sensibilidad al clivado y la susceptibilidad a la purificación. Los datos se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14

Nombre del ligador	Optimización del codón G4S[1]	Extremo de CH3	Secuencia de aminoácidos de las variantes del ligador de escorpión S0129	Secuencia del ligador basada en	Expresión (%S0123)[2]	Clivado3	Purificación comparativa POI
Name	optimization	CH3	amino acid seq	based on	(%S0129)	Cleavage	%POI
H7	N	K	GCPPCPNS	H7	100	-	70
H60	Y(17)	K	GCPPCPNS	H7	114	-	ND
H61	Y(15)	K	GCPPCPNS	H7	90	-	66
H62	N	G	QRHNNSSLNTRTQKARHCPNS	NKG2A stalk	129	-	89
H63	Y(17)	G	QRHNNSSLNTRTQKARHCPNS	NKG2A stalk	100	-	85
H64	Y(15)	G	QRHNNSSLNTRTQKARHCPNS	NKG2A stalk	81	-	83
H65	N	G	EPAFTPGPNIELQKDSDCPNS	CD94 stalk	133	-	66
H66	Y(17)	G	EPAFTPGPNIELQKDSDCPNS	CD94 stalk	200	-	64
H67	Y(15)	G	EPAFTPGPNIELQKDSDCPNS	CD94 stalk	129	-	65
H68	N	G	RTRYLQVSQQLQQTNRVLEVTNSSLRQQLR LKITQLGQSAEDLQGSRRELAQSQEALQVEQ RAHQAAEGQLQACQADRQKTKETLQSEEQ QRRALEQKLSNMENRLKPFFTCGSADTC	CD72 full stalk	110	-	75

[1]Optimización del codón del ligador Gly4Ser, con (17) o sin (15) sitio de restricción
[2]Expresión den COS estimada según la recuperación de proteínas en la purificación comparativa
[3]Productos del clivado observados por SDS-PAGE/tinción con azul de Coomassie de la proteína purificada

b. Enlazamiento de los dominios de enlace del extremo N terminal y C terminal

Tanto el dominio N terminal como el dominio C terminal participan en el enlazamiento de células diana

Las capacidades de enlace de la célula diana de un CD20 SMIP (TRU015), un CD37 SMIP (SMIP016), una combinación de CD20 SMIP y CD37 SMIPS (TRU015+SMIP016) y CD20xCD37 de escorpión biespecífico (015x016), se evaluaron al medir la capacidad de cada una de estas moléculas para bloquear el enlace de un anticuerpo específicamente en competencia por el enlace con la diana pertinente, ya sea CD37 o CD20. Los anticuerpos en competencia fueron anticuerpo monoclonal anti-CD37 marcado con FITC o el anticuerpo monoclonal anti-CD20 marcado con PE, según convenga. Los linfocitos B Ramos proporcionaron las dianas.

Se agregaron linfocitos B Ramos en un nivel de 1,2 x 10^7/ml en PBS con 5% de suero de ratón (#100-113, Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA) (medio de tinción) a placas de fondo en V de 96 pocillos. Los diversos SMIP y los escorpiones se diluyeron a 75 µg/ml en medio de tinción y las diluciones de 4 veces se realizaron a las concentraciones indicadas en la Figura 38. Los compuestos diluidos se agregaron a las células cultivadas además del medio solo para los pocillos de control. Las células se incubaron durante 10 minutos con los compuestos y luego se agregaron anticuerpo anti-CD37 conjugado en FITC (#186-040, Ancell, Bayport, MN) en un nivel de 5 µg/ml y anticuerpo anti-CD20 conjugado en PE (#555623, BD Pharmingen, San Jose, CA) en un nivel de 3 µg/ml (puro) a los pocillos en 25 µl de medio de tinción. Las células se incubaron sobre hielo en la oscuridad durante 45 minutos y luego se lavaron 2,5 veces con PBS. Las células se fijaron con 1% de formaldehído (#19943 1 LT, USB Corp, Cleveland, OH) y se corrieron en un equipo FACs Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA). Los datos se analizaron con el software Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA). Los resultados que se muestran en la Figura 38 establecen que todos los SMIP

las combinaciones de SMIP y los escorpiones que contenían sitio de enlace a CD20 compitieron satisfactoriamente con anticuerpo anti-CD20 marcado con PE para el enlace de linfocitos B Ramos (panel superior); todos los SMIP, combinaciones de SMIP y escorpiones que contenían un sitio de enlace CD37 compitieron satisfactoriamente con anticuerpo anti-CD37 marcado con FITC para el enlace de linfocitos B Ramos (panel inferior). Por lo tanto, la CD20xCD37 de escorpión biespecífico mostró tener sitios de enlace operables en los extremos N y C terminales para las dianas de los linfocitos B.

c. Persistencia de la superficie celular

Una investigación de la persistencia de la superficie celular de los SMIP y escorpiones enlazados (monoespecíficos y biespecíficos) en la superficie de los linfocitos B reveló que los escorpiones presentaron mayor persistencia de la superficie celular que los SMIP. Los linfocitos B Ramos en 6 x 10^6 /ml (3 x 10^5/pocillo) en medio de tinción (2,5% de suero caprino; 2,5% de suero de ratón en PBS) se agregaron a placas de fondo en V de 96 pocillos. Los reactivos de prueba se elaboraron en el doble de la concentración final del medio de tinción haciendo una dilución en serie de 5 veces de 500 nM de solución madre inicial y luego se agregaron 1:1 de linfocitos B Ramos. Además, se cultivaron medios de control. Las células se incubaron en la oscuridad, sobre hielo, durante 45 minutos. Las placas luego se lavaron 3,5 veces con PBS frío. El reactivo secundario, anticuerpo anti-IgG humana de caprino conjugado en FIT (#H10501, Caltag/Invitrogen, Carlsbad, CA) se agregó en una dilución 1:100 en medio de tinción. Las células se incubaron en la oscuridad, sobre hielo, durante 30 minutos. Las células se lavaron 2,5 veces por centrifugación con PBS frío, se fijaron con 1% de solución de formaldehído (#19943 1 LT, USB Corp, Cleveland, OH) y se corrieron en un equipo FACs Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA). Los datos se analizaron con el software Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA). Los resultados del análisis de datos se presentan en la Figura 37, que muestra el enlace de varios SMIP, una

CD20xCD20 de escorpión monoespecífico y un CD20xCD37 de escorpión monoespecífico a sus dianas en los linfocitos B Ramos.

Dos tubos de linfocitos B Ramos (7 x 10^5/ml) se incubaron durante 30 minutos sobre hielo con cada uno de los compuestos que se estaban investigando, es decir CD20 (2Lm20-4) SMIP humanizado y un CD20xCD20 (2Lm20-4x2Lm20-4) de escorpión humanizada, cada uno en un nivel de 25 µg/ml en medio Iscoves con 10% de FBS. Al final del período de incubación, ambos tubos se lavaron 3 veces mediante centrifugación. Un tubo de las células luego se colocó en las placas de fondo plano de 96 pocillos en un nivel de a $2x10^5$ células / pocillo en 150 µl del medio Iscoves con una placa que luego se colocó en la incubadora a 37°C y la otra placa incubada en el hielo. El segundo tubo de cada conjunto se resuspendió en PBS frío con 2% de suero de ratones y 1% de azida de sodio (medio de tinción) y se colocó en una placa de fondo en V de 96 pocillos en un nivel de $2x10^5$ células/pocillo para la tinción inmediata con el anticuerpo secundario, es decir, anticuerpo anti-IgG humana de caprinos conjugado en FITC (#H10501, Caltag/Invitrogen, Carlsbad, CA). El anticuerpo secundario se agregó en una dilución final 1:100 en los medios de tinción y las células se mancharon sobre hielo, en la oscuridad, durante 30 minutos. Luego las células se lavaron 2,5 veces con PBS frío y se fijaron con 1% de paraformaldehído (#19943 1 LT, USB Corp, Cleveland, OH).

En los puntos de tiempo designados en la Figura 39, las muestras se cosecharon de las placas de fondo plano de 96 pocillos, se incubaron a 37°C o bien sobre hielo, y se colocaron en placas con fondo en V de 96 pocillos (2 x 10^5 células/pocillo). Las células se lavaron una vez con medios de tinción en frío, se resuspendieron, y el anticuerpo secundario se agregó a una dilución final de 1:100 en los medios de tinción. Las células se incubaron en la oscuridad, sobre hielo, durante 30 minutos. Las células luego se lavaron 2,5 veces mediante centrifugación en PBS frío y posteriormente se fijaron con 1% de paraformaldehído. Las muestras se corrieron en un equipo FACS

Calibur (BD Biosciences, San José, CA) y los datos se analizaron con el software CellQuest (BD Biosciences, San Jose, CA). Los resultados que se presentan en la Figura 39 demuestran que el enlace de un SMIP y un escorpión a la superficie de los linfocitos B durante, al menos, seis horas, con CD20xCD20 (2Lm20-4x2Lm20-4) de escorpión humana biespecífica que persisten en mayor grado que el CD20 (2Lm20-4) SMIP humano.

Ejemplo 15

Destrucción directa de células con moléculas de escorpión monoespecíficas y biespecíficas

Los experimentos se condujeron para evaluar la capacidad de las moléculas de escorpión monoespecíficas y biespecíficas para destruir directamente las células de linfoma, es decir, para destruir estas células sin participación de ADCC o CDC. En particular, las líneas celulares de linfoma Su-DHL-6 y DoHH2 se sometieron en forma separada a moléculas escorpión monoespecíficas, es decir una CD20xCD20 de escorpión o un CD37xCD37 de escorpión, o una CD20xCD37 de escorpión biespecífica.

Los cultivos de células de linfoma Su-DHL-6, DoHH2, Rec-1 y WSU-NHL se establecieron con el uso de técnicas convencionales y algunos de estos cultivos luego se expusieron individualmente a CD20 SMIP monoespecífico, (CD20xCD20 o CD37xCD37) de escorpión monoespecífico o (CD20xCD37 o CD19xCD37) de escorpión biespecífico. La exposición de las células a SMIP o escorpiones se condujo en condiciones que no resultaron en reticulación. Las células permanecieron en contacto con las moléculas durante 96 horas, después de las cuales el crecimiento se midió mediante la detección de la ATP, según se conoce en el arte. La destrucción de células atribuible a CD20 SMIP y la CD20xCD20 de escorpión monoespecífico queda en evidencia en la Figura 24 y la Tabla 15. La capacidad de destrucción de células de

la CD37xCD37 de escorpión monoespecífico se aprecia en la Figura 25 y la Tabla 15; la capacidad de la D20xCD37 de escorpión biespecífica para destruir las células de linfoma se aprecia en la Figura 26 y la Tabla 15 y la capacidad de la CD19xCD37 de escorpión biespecífica para matar las células de linfoma queda reflejada en la Figura 27 y la Tabla 15. Se mancomunaron los datos a partir de tres experimentos independientes y los puntos representan los valores de la media ± error estándar de la media. Los valores de la IC_{50} en la Tabla 15 se determinaron a partir de las Figuras 24, 25, y 26, tal como se indica en la leyenda de la Tabla 15, y se define como la concentración resultante del 50% de inhibición en comparación con los cultivos no-tratados. Los datos de las figuras y la tabla demuestran que los escorpiones tienen una potencia de destrucción de más de 10 veces para destruir estas líneas celulares que los SMIP libres con el empleo de los mismos dominios de enlace.

Tabla 15

	Línea celular		
IC_{50} (nM)	SU-DHL-6	DoHH2	WSU-NHL
CD20 SMIP*	>100	60	NA
CD20xCD20 de escorpión*	0.3	4.0	NA
CD37 SMIP**	>100	>100	NA
CD37xCD37 de escorpión**	10	1.2	NA
CD20 SMIP y CD37 SMIP***	6	2	NA
CD20xCD37 de escorpión***	0.05	0.05	NA
CD19 SMIP y	0.16	NA	0.40

	Línea celular		
CD37 SMIP****			
CD19xCD37 de escorpión****	0.005	NA	0.04

* Datos derivados de la Figura 24.

** Datos derivados de la Figura 25.

*** Datos derivados de la Figura 26.

**** Datos derivados de la Figura 27.

Se hicieron otros experimentos con la CD20xCD20 de escorpión S0129 humanizado en células Su-DHL-4, Su-DHL-6, DoHH2, Rec-1 y WSU-NHL. Los resultados se presentan en las Figuras 46 y 47. Los datos proporcionados en estas figuras extienden los resultados tratados previamente al indicar que los escorpiones tienen la capacidad de destruir directamente una variedad de líneas celulares.

Se extendieron los resultados anteriores a otros escorpiones monoespecíficos y biespecíficos, donde cada escorpión demostraba la capacidad de matar directamente los linfocitos B. Los linfocitos B DoHH2 se expusieron *in vitro* al CD20xCD20 de escorpión monoespecífico, un CD37xCD37 de escorpión monoespecífico, o un CD20xCD37 de escorpión monoespecífico. Los resultados que se presentan en la Figura 48 demuestran que los escorpiones biespecíficos tienen curvas de destrucción con formas diferentes de las correspondientes a los escorpiones monoespecíficos.

El cultivo de células Su-DHL-6 en la presencia de 70 nM de CD20xCD20 de escorpión (S0129), CD20xCD37 de escorpión, o CD37xCD37 de escorpión también derivó en la destrucción de linfocitos B en un entorno *in vivo* (Figura 49). De manera coincidente, las células Su-DHL-6 expuestas a CD19xCD37 de escorpión biespecífico o a Rituxan® llevaron a la destrucción directa de células, donde el escorpión biespecífico exhibía letalidad a menores dosis, según se revela en la Figura 50.

Se proporcionó otra demostración de la destrucción directa de células al exponer las células DHL 4 a cuatro escorpiones monoespecíficos independientes que reconocían CD20. Dos versiones de CD20xCD20 de escorpión se diseñaron para incorporar dos dominios de enlace 20-4 (20-4x20-4 y S0129) y el segundo incorporó un híbrido de los dominios de enlace 011 y 20-4. Las cuatro versiones construidas de manera independiente y purificadas de los diseños de CD20xCD20 de escorpión (20-4x20-4 y S0129) y (011x20-4 y 011x20-4ΔAsp) híbrido, destruyen de manera eficaz las células DHL-4 de manera directa. Para este estudio, las células 4-DHL fueron tratadas *in vitro* con 1 µg/ml de las proteínas indicadas durante 24 horas. Las células luego se mancharon con anexina V y yoduro de propidio, marcadores tempranos y tardíos de la destrucción celular, respectivamente, y las poblaciones de células fueron cuantificadas por FACS. Los resultados presentados en la Figura 51 establecen la capacidad de destrucción directa de cada una de las construcciones CD20xCD20, según se demuestra por el aumento de la tinción manifestado en las barras negras. Del mismo modo, los resultados demuestran que las proteínas híbridas 011x20-4 presentaron un aumento leve de la destrucción directa de células en relación con 20-4x20-4 a base de escorpiones, a pesar del hecho de que cada uno de estos escorpiones reconoció de manera monoespecífica la molécula CD20. En otro conjunto de experimentos, la respuesta a la dosis de las cuatro construcciones de escorpiones independientes se determinó mediante el análisis de FACS de poblaciones de células teñidas con anexina V y yoduro de propidio. Los resultados, mostrados en la Figura 52, demuestran los aumentos de la respuesta a la dosis en la muerte de células que es resultado del tratamiento de las células DHL 4 con cada una de las construcciones de escorpiones independientes.

Ejemplo 16

Funciones accesorias mediadas por escorpiones (ADCC & CDC)

a. Citotoxicidad celular dependiente de escorpión

Se realizaron experimentos para determinar si los escorpiones median la destrucción de células de linfoma B BJAB. Se observó que las células de linfoma B BJAB eran destruidas con CD20 y/o CD37 de escorpiones.

Inicialmente, los linfocitos B BJAB (1 x 10^7/ml) se marcaron con 500 µCi/ml ^{51}Cr de cromato de sodio (#CJS1, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) durante 2 horas a 37°C en medio Iscoves con 10% de FBS. Los linfocitos B BJAB cargados con ^{51}Cr se lavaron tres veces en medio RPMI con 10% de FBS y se resuspendieron en un nivel de 4 x 10^5/ml en RPMI. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes internos se aislaron de la sangre entera haparinizada mediante conjugación en medio de separación de linfocitos (#50494, MP Biomedicals, Aurora, Oh), se lavaron 2 veces con medio RPMI y se resuspendieron en un nivel de 5x10^6/ml en RPMI con 10% de FBS. Se agregaron muestras de reactivo al medio RPMI con 10% de FBS en 4 veces la concentración final y se prepararon tres diluciones en series de 10 veces para cada reactivo. Estos reactivos se agregaron luego a placas de 96 pocillos con fondo en U de 50 µl/pocillo para las concentraciones finales indicadas. Los linfocitos BJAB con marca ^{51}Cr se agregaron a las placas en un nivel de 50 µl/pocillo (2 x 10^4 células/pocillo). Las PBMC luego se agregaran a las placas en un nivel de 100 µl/pocillo (5 x 10^5 células/pocillo) para alcanzar una proporción final de 25:1 efector (PBMC):diana (BJAB). Se agregaron efectores y dianas al medio solo para medir la destrucción de fondo. Los linfocitos BJAB con marca ^{51}Cr se agregaron al medio solo para medir la liberación espontánea de ^{51}Cr y a medio con 5% de NP40 (número de catálogo 28324, Pierce, Rockford, IL) para medir la liberación máxima de ^{51}Cr. Las placas se incubaron durante 6 horas a 37 °C, en 5% de CO_2. Cincuenta µl (25 µl también serían adecuados) del sobrenadante de cada pocillo se transfirieron a una

placa Luma de 96 pocillos (#6006633, Perkin Elmer, Boston, Mass) y se secaron durante toda la noche a temperatura ambiente.

Después de secarse, las emisiones radiactivas se cuantificaron como cpm en un equipo Packard TopCount-NXT. Los valores de la muestra eran la media de las muestras triplicadas. La destrucción específica porcentual se calculó utilizando la siguiente ecuación: % de destrucción = ((muestra – liberación espontánea)/(liberación máxima – liberación espontánea)) x 100. Los gráficos de la Figura 30 muestran que los linfocitos B BJAB fueron destruidas por CD20xCD20 y CD37xCD37 de escorpiones monoespecíficos. La combinación de CD20 SMIP y CD37 SMIP también destruyen linfocitos B BJAB. Estos resultados demuestran que los escorpiones presentan la citotoxicidad celular dependiente de escorpión y se espera que proporcionen esta funcionalidad a la subregión constante del escorpión, proporcionando actividad ADCC.

b. Función del escorpión en la citotoxicidad dependiente de complemento

Los experimentos también demostraron que los escorpiones tienen actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). El experimento incluyó la exposición de linfocitos B Ramos a SMIP CD19 y/o CD37 y los escorpiones, según se describe más adelante y como se muestra en la Figura 31.

El experimento se inició por el agregado de 5 a 2,5 x 10^5 de linfocitos B Ramos a los pocillos de las placas de fondo en V de 96 pocillos en 50µl del medio de Iscoves (sin FBS). Los compuestos de prueba en Iscoves, (o Iscoves solo) se agregaron a los pocillos en 50µl al doble de la concentración final indicada. Las células y los reactivos se incubaron durante 45 minutos a 37°C. Las células se lavaron 2,5 veces en medio Iscoves sin FBS y se resuspendieron en Iscoves con suero humano (# A113, Quidel, San Diego, CA) en las placas de 96 pocillos en las concentraciones indicadas. Las células y los reactivos luego se incubaron durante 90 minutos a 37°C. Las células de lavaron por centrifugación y se resuspendieron en 125 µl de PBS frío. Las células se transfirieron a tubos de agrupaciones FAC (#4410, CoStar, Corning, NY) y se agregaron

125 µl de PBS con yoduro de propidio (# P-16063, Molecular Probes, Eugene, OR) en un nivel de 5 µg/ml. Las células se incubaron con el yoduro propidio durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, y luego se colocaron en el hielo, se cuantificaron y se analizaron en un equipo FACsCalibur con software CellQuest (Becton Dickinson). Los resultados presentados en la Figura 31 establecen que el CD19 SMIP, pero no el CD37 SMIP, presenta actividad CDC, mientras que una combinación de los dos SMIP presenta aproximadamente el mismo nivel de actividad de CDC que CD19 SMIP solo El CD19xCD37 de escorpión, sin embargo, presentó significativamente mayor actividad de CDC que los SMIP solos o en combinación, estableciendo que la arquitectura de escorpión proporciona un mayor nivel de citotoxicidad dependiente del complemento que otros diseños moleculares.

c. Actividad de la ADCC/CDC de CD20xCD20 de escorpiones monoespecíficos

Tres CD20xCD20 de escorpiones monoespecíficos diferentes se examinaron para determinar la funcionalidad de la ADCC y la CDC, junto con los controles apropiados. Se hizo un ensayo de ADCC con el uso de las técnicas convencionales, y los resultados se presentan en la Figura 53. En la Figura se observa la actividad de ADCC apreciable, pero no idéntica, asociada con cada uno de estos CD20xCD20 de escorpiones monoespecíficos.

Para evaluar la CDC, se incubaron muestras de linfocitos B Ramos ($4x10^5$) con cada uno de los CD20xCD20 de escorpión (0; 0,5; 5; 50 y 500 nM) y suero (10% durante 3,5 horas a una temperatura de 37°C. Las células muertas se evaluaron con tinción 7-AAD y análisis FACS. Los resultados se presentan en la Figura 54, que revela que los escorpiones presentan alguna actividad de CDC. En un experimento similar, las muestras de linfocitos B Ramos (4×10^5) se incubaron con proteína CD20xCD20 de escorpión (5; 50; 100 nM) y suero (10%) durante 2 horas a 37°C. Las células se lavaron 2X y se incubaron con anticuerpo anti-C1q humano conjugado en FITC. Se

evaluó el C1q enlazado mediante análisis FACS, y los resultados se presentan en la Figura 55. Estos resultados coinciden con los resultados presentados en la Figura 54 en que cada uno de los CD20xCD20 de escorpiones monoespecíficos se asoció con alguna actividad CDC, si bien la actividad fue menor que la asociada a CD20 SMIP.

d. Interacciones de los escorpiones con $F_{c}\gamma$RIII

Los estudios ELISA demostraron que los escorpiones enlazados a FcγRIII (CD16) bajo (aelotipo o isoforma de baja actividad) en mayores niveles en ausencia de las células diana. Las placas del ensayo ELISA inicialmente se recubrieron con CD16mIgG de baja o alta afinidad con el empleo de técnicas convencionales. Se evaluó la capacidad de esta proteína de fusión de captar CD20 SMIP o a CD20xCD20 de escorpión monoespecífico. Los SMIP enlazados y los escorpiones se detectaron con anticuerpo secundario anti-IgG humana proveniente de caprino (HRP) y se determinó la intensidad de fluorescencia media (MFI, *por su sigla en inglés*). El PBS solo (control negativo) se muestra como un único punto. Los resultados se presentan en la Figura 32A (captura por parte de la fusión de la isoforma de alta afinidad CD16), y 32B (captura por parte de la fusión de la isoforma de baja afinidad CD16). Según se ve en las Figuras 32A y 32B, tanto CD20 SMIP como CD20xCD20 de escorpión monoespecífico mostró mayor enlace, a las fusiones de la isoforma CD16, tanto de alta como de baja afinidad, donde el CD20xCD20 de escorpión muestra un gran incremento del enlace en la fusión de la isoforma de baja afinidad con creciente concentración de proteínas.

El enlace de los escorpiones a las isoformas FcγRIII en la presencia de las células diana también se evaluó. Los datos muestran un mayor enlace de los escorpiones, a las isoformas o alelotipos de FcγRIII (CD16), tanto de baja como de alta afinidad, en la presencia de células diana con creciente concentración de proteínas.

Al realizar la experimentación, las células diana positivas a CD20 se expusieron a CD20 SMIP o CD20xCD20 de escorpiones monoespecíficos en condiciones que

permitieron el enlace de SMIP o escorpión a la célula diana positiva a CD20. Posteriormente, la célula diana que porta SMIP ó escorpión se expuso a isoforma CD16 de baja o alta afinidad, marcada con IgFc de ratón. Luego se agregó Fc anti-ratón proveniente de caprino como un anticuerpo secundario para marcar el CD16 inmovilizado marcado con el ratón IgFc. Luego se detectaron células usando citometría de flujo en un equipo FACs Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA) y se analizaron con software CellQuest (BD Biosciences, San Jose, CA). Tal como se observa en la Figura 33, mayores concentraciones de cada uno de CD20 SMIP y CD20xCD20 de escorpión monoespecíficos llevaron a un aumento del enlace con las isoformas CD16 en la presencia de células diana, y el mayor enlace del CD20xCD20 de escorpión fue más significativo que el mayor enlace que se observó con los CD20 SMIP.

Ejemplo 17

Efectos del ciclo celular de los escorpiones sobre las células de linfoma

Se evaluaron los efectos del ciclo celular de los escorpiones exponiendo células de linfoma a SMIP, escorpiones monoespecíficos y escorpiones biespecíficos. Más particularmente, las células de linfoma DoHH2 (0,5 x 10^6) se trataron durante 24 horas con 0,4 nM de rituximab, CD20xCD37 de escorpión, combinación de TRU-015 (CD20 SMIP) + SMIP-016 (0,2 nM de cada uno), 100 nM SMIP-016 o 100 nM CD37xCD37 de escorpión. Estas concentraciones representan cerca de10 veces más que el valor IC50 del escorpión en un ensayo de inhibición del crecimiento durante 96 horas (ver las Figuras 24-27). Los cultivos se marcaron durante 20 minutos a 37°C con 10 µM de BrdU (bromodeoxiuridina). Después de la fijación, las células se tiñeron con anticuerpo anti-BrdU-FITC y se contra-tiñeron con yoduro de propidio. Los valores de la Figura 28 son los valores medios +/- de desvío estándar de 4 cultivos replicados de 2 ó 3 experimentos independientes. Todos los datos ilustrativos se analizaron al mismo tiempo y se mancomunaron para la presentación usando matrices de punto para la

incorporación de BrdU y PI. Los trazados demuestran que un efecto importante del tratamiento con escorpiones es una depleción de las células en fase S, al igual que un aumento del compartimiento G_0/G_1.

Ejemplo 18

Efectos fisiológicos de los escorpiones

a. Potencial mitocondrial

Los CD20xCD20 de escorpión indujeron una pérdida de la membrana mitocondrial en células DHL4 B- según se revela en un ensayo JC-1. JC-1 es una tintura a base de carbocianina catiónica que exhibe acumulación dependiente del potencial en la mitocondria (Mitoprobe® kit de ensayo de JC-1 para citometría de flujo de Molecular Probes). JC-1 es más específico para la membrana mitocondrial que la membrana plasmática y se usa para determinar los cambios en el potencial de la membrana mitocondrial. La acumulación en la mitocondria es indicada por un cambio de fluorescencia del verde (529 nm) al rojo (590 nm).

Al conducir el experimento, los linfocitos B 4-DHL (5 x 10^5células/ml) se cultivaron inicialmente en placas de 24 pocillos y se trataron durante 24 horas con 1 µg/ml de CD20xCD20 de escorpión, Rituximab, anticuerpo de control de la IgG, o 5 µM de estaurosporina a 37°C, 5% de CO_2, en una incubadora para cultivo tisular de tipo estándar. Se agregó la tintura JC-1 (10 µl/ml, concentración final de 2 µM) y las células se incubaron durante otros 30 minutos a 37°C. Las células se cosecharon mediante centrifugación (5 minutos a 1200 rpm), se lavaron con PBS 1ml y se resuspendieron en 500 µl de PBS. Las células fueron analizadas por citometría de flujo (FACSCalibur, BD) con excitación a 488 nM y 530 nM, y filtros de emisión de 585nM. Para los gráficos de dispersión representativos de la Figura 56, se midió la fluorescencia roja en el eje de las Y y la fluorescencia verde se midió en el eje de las X. La despolarización de la membrana mitocondrial se midió como una disminución en la fluorescencia roja,

según se observó en la CCCP de control positivo (carbonilo de cianuro 3-clorofenilhidrazona), un interruptor del potencial de la membrana mitocondrial conocido. Para confirmar que la JC-1 fue receptiva a los cambios en el potencial de la membrana, los linfocitos B 4-DHLI se trataron con dos concentraciones de CCCP (50 µM y 250 µM) durante 5 minutos a 37°C, 5% de CO_2. Un control positivo adicional, fueron las células tratadas con el inhibidor de quinasa de amplio espectro, estaurosporina, para inducir la apoptosis. Los resultados mostrados en la Figura 56 son los gráficos de matriz de punto de 10.000 recuentos, con la fluorescencia roja representada en el eje de las Y y la fluorescencia verde representada en el eje de las X. En la Figura 56 se muestra un histograma resumen del porcentaje de células con potencial de membrana mitocondrial alterado (MM P alterado: barras negras). Estos resultados demuestran que el tratamiento con 20-4x20-4 de escorpión o 011x20-4 de escorpión generó una disminución en el potencial de membrana mitocondrial asociado con la muerte de células.

b. Flujo de calcio

Las moléculas de escorpión se analizaron para determinar las influencias en las vías de señalización celular, usando la movilización Ca^{++}, una característica común de la señalización celular, según una medida correspondiente. Las células de linfoma SU-DHL-6 se marcaron con tintura de calcio 4 y se trataron con las moléculas de prueba que se identifican más adelante. Se leyeron las células durante 20 segundos para determinar la fluorescencia de fondo, y se agregaron los SMIP/escorpiones (primera línea punteada en la Figura 28), y la fluorescencia se midió a los 600 segundos. A los 600 segundos, se agregó un exceso de 8 veces de anticuerpo anti-F(ab)'2 humano proveniente de caprino reticulado y se midió la fluorescencia durante otros 300 segundos. El panel (A) de la Figura 28 muestra los resultados obtenidos con una combinación de CD20 SMIP y CD37 SMIP (línea roja); u obtenidos con CD20xCD37 de escorpión biespecífico (línea roja), en comparación con las células no-estimuladas

27A

(línea azul) En el panel B de la Figura 28, los resultados del tratamiento de células con CD20 SMIP solo (línea roja) dieron como resultado la movilización de Ca^{++}, pero no fue tan sólida como la señal generada por CD20xCD20 de escorpión monoespecífico (línea negra). Los gráficos de movilización de Ca^{++} de la Figura 28 representan la fluorescencia de pocillos triplicados con cantidades equimolares de escorpión y combinaciones de SMIP/SMIP.

c. Caspasas 3, 7 y 9

La capacidad de los escorpiones de enlazarse a CD20 para destruir directamente los linfocitos B, según se evidencia por la mayor tinción de anexina V y yoduro de propidio, y la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial llevaron a una investigación más profunda de los efectos adicionales relacionados con la apoptosis de escorpiones de enlace con CD20 en linfocitos B. El enfoque adoptado fue realizar ensayos Apo1 en linfocitos B DHL-4 expuestos a CD20xCD20 de escorpión o los controles apropiados. El ensayo de Apo1 se basa en el sustrato de péptidos sintéticos para la caspasa 3 y 7. Los componentes del ensayo se adquieren a Promega (Apo-ONE® Homogeneuous Caspase-3/7 Assay). El clivado mediado por caspasa del péptido Z-DEVD marcado-Rodamina 110 libera la marca de rodamina fluorescente 110, que se mide utilizando excitación a 485 nm y detección a 530 nm.

Para el experimento, 100 µl de linfocitos B 4-DHL (5 x 10^5células/ml) se colocaron en placas de base plana de 96 pocillos y se trataron durante 24 ó 48 horas con 1 µg/ml de CD20xCD20 de escorpión, Rituximab, un anticuerpo de control anti-IgG, o 5 µM de estaurosporina a 37°C, con 5% de CO_2, en una incubadora para cultivo tisular de tipo estándar. (La estaurosporina es una molécula pequeña, inhibidora de la proteína quinasa de amplio espectro, que se conoce en el arte como potente inductora de apoptosis clásica en una amplia variedad de tipos celulares). Después 24 o 48 horas, se agregaron a cada pocillo 100 µl del sustrato diluido 100 veces, se mezcló suavemente un minuto en un agitador de placas (300 rpm) y se incubaron a

temperatura ambiente durante dos horas. Se midió la fluorescencia utilizando excitación a 485 nM y filtro de emisión de 527 nM (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Labsystems). Los gráficos que muestran la intensidad fluorescente promedio de los tratamientos triplicados más / menos desviación estándar después de 24 horas y de 48 horas (24 horas sólo para estaurosporina) se presentan en la Figura 57. Estos resultados establecen que los escorpiones de enlace a CD20 no destruyen directamente los linfocitos B por una vía apoptótica que incluye la activación de caspasa 3/7.

Los resultados obtenidos en el análisis 1-Apo fueron confirmados por los análisis de transferencia de Western diseñados para detectar el clivado pro-caspasa resultante en caspasa activada o para detectar el clivado de PARP (poli (ADP-ribosa) polimerasa), una proteína conocida por clivarse por caspasa activada 3. Los linfocitos B DHL 4 se expusieron a un escorpión de enlace a CD20 o un control durante 4, 24 o 48 horas y los lisados de células se fraccionaron en SDS-PAGE y se transfirieron mediante análisis Western usando técnicas convencionales. La Figura 58 presenta los resultados en forma de una colección de las transferencias Western. Los tres análisis Western de fondo utilizaron anticuerpos anti-caspasa para detectar cambios en el peso molecular de la enzima caspasa, reflejando la activación proteolítica. Para las caspasas 3, 7, y 9, no había ninguna evidencia de la activación por caspasa en ninguna de las moléculas de enlace con CD20. La estaurosporina sirvió como control positivo para el análisis, y el clivado por-caspasa inducida, para activar la caspasa para cada una de las caspasas 3, 7 y 9. La cuarta transferencia Western mostrada en la Figura 58 revela que PARP, un sustrato conocido de caspasa activado 3, no se clivó, en consistencia con un fallo de los escorpiones de enlace con CD20 para activar la caspasa 3. Los resultados de todos estos experimentos son muestran uniformemente que la activación de caspasa 3 no es una característica significativa de la destrucción directa de células los linfocitos B DHL 4 inducida por los escorpiones de enlace CD20.

Además, se realizó un estudio para determinar el efecto de las proteínas de enlace CD20, incluido un CD20xCD20 de escorpión, en caspasa 3. Las células DoHH2 o los linfocitos B Su-DHL-6 se incubaron con 10 nM de proteína de enlace CD20 (S0129 de escorpión, 2Lm20-4 SMIP, o Rituxan®) +/- CD16 Ig soluble (40nM), CD16 de Ig soluble solo o medio. Las células se cultivaron en RPMI completo con 10% FBS a $3x10^5$/pocillo/300µl y se cosecharon a las 4 horas, 24 horas o las 72 horas. Las muestras en el punto de tiempo de 72 horas se colocaron en placas con 500 µl del agente de prueba. Las células se lavaron con PBS y luego se mancharon para determinar caspasa-3 activa intracelular usando el kit BD Pharmingen Caspase 3, Active Form, mAB Apoptosis Kit:FITC (número de catálogo 55048, BD Pharmingen, San Jose, CA). Brevemente, después de 2 lavados adicionales en PBS frío, las células se suspendieron en la solución fría de cytofix/cytoperm y se incubaron en el hielo durante 20 minutos. Las células luego se lavaron mediante centrifugación, se aspiraron y se lavaron dos veces con amortiguador de Perm/Lavado a temperatura ambiente. Las muestras posteriormente se mancharon con 20µl de FITC-anti-caspasa 3 en 100 µl de solución amortiguadora Perm-Wash a temperatura ambiente en la oscuridad durante treinta minutos. Después, se lavaron las muestras dos veces con solución amortiguadora Perm-Wash, y se resuspendieron en 500 µl de solución amortiguadora Perm-Wash. Luego se transfirieron las células a tubos FAC y se corrieron en un equipo FACs Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA) y se analizaron con software CellQuest (BD Biosciences, San Jose, CA). Los resultados se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16

Molécula (10 nM)	**Porcentaje de células positivas a caspasa-3**			**Porcentaje en compuerta [de células vivas]**		
	4 horas	24 horas	48 horas	4 horas	24 horas	48 horas
RTXN	7	25	7	75	53	56

Molécula (10 nM)	**Porcentaje de células positivas a caspasa-3**			**Porcentaje en compuerta [de células vivas]**		
y CD16 hi (4X)	27	47	21	79	60	43
CD20 SMIP (2Lm20-4)	5	5	10	89	85	81
y CD16 hi	28	54	21	61	60	41
CD20xCD20 de escorpión humanizado (S00129)	7	13	14	69	68	61
y CD16 hi	30	31	15	67	75	72
Medio	7	5	9	89	82	80
y CD16 hi	6	5	9	91	83	80

Los resultados de todos estos experimentos coinciden en mostrar que hay activación limitada de caspasa 3 en ausencia de CD16, que no implica la activación de caspasa 3 como una característica significativa de la destrucción directa de células inducida por los escorpiones de enlace a CD20.

d. Fragmentación de ADN

La inducción de las vías de señalización apoptótica clásicas da lugar, en último término, a la condensación y el deterioro fragmentado del ADN cromosómico. Para determinar si los escorpiones de enlace con CD20 mataron directamente los linfocitos B a través de un mecanismo apoptótico clásico, el estado del ADN cromosómico de linfocitos B se examinó después de la exposición de las células a los escorpiones de enlace con CD20, o los controles. Inicialmente, los linfocitos B-DHL-4 fueron tratados

in vitro durante 4, 24 ó 48 horas con una molécula de enlace a CD20, es decir, el CD20xCD20 de escorpión monoespecífico (2Lm20-4x2Lm20-4), el CD20xCD20 (011x2Lm20-4) de escorpión, o Rituximab o con un control. Posteriormente, se lisaron las células y se purificó el ADN cromosómico usando las técnicas convencionales. El ADN coromosómico luego se fraccionó por tamaño mediante electroforesis en gel. El electroforetograma en gel de la Figura 59 revela una falta de fragmentación de ADN que demostró que la muerte celular generada por escorpiones de enlace a CD20 no fue mediada por una vía apoptótica clásica. Se utilizaron las células tratadas con estaurosporina como control positivo en estos ensayos.

e. Fosforilación de SYK

SKY es una proteína fosforegulada con varios sitios de fosforilación que funciona como un represor transcripcional. SYK se localiza en el núcleo de las células, pero es capaz de reubicarse rápidamente en la membrana con la activación. Para la activación, la SYK debe retener su secuencia de localización nuclear. La SYK activada tiene una función en la supresión de los tumores de cáncer de mama y la SYK es activada por las señales proapoptóticas, tales como radiación ionizante, la ligadura de BCR y la reticulación de MHC de clase II. Sumado a ello, la SKY demostró afectar el PLCγ y las vías de Ca^{++}. Dadas estas observaciones, se investigó la capacidad que tenían los escorpiones de enlace con CD20 de afectar la SYK.

Los linfocitos B DHL-6 se expusieron a CD20xCD37 de escorpión biespecífico 0, 5, 7 o 15 horas, y luego se lisaron las células. Los lisados fueron immunoprecipitados con un anticuerpo anti-fosfotirosina o con un anticuerpo anti-SYK. Los immunoprecipitados se fraccionaron mediante la electroforesis en gel y los resultados se muestran en la Figura 60. De la observación de la Figura 60, surge el hecho de que CD20xCD37 de escorpión no induce la fosforilación de SKY, con lo cual la activa. Compatible con los estudios descriptos anteriormente sobre la activación de caspasa y la fragmentación de ADN cromosómico, no parece que los escorpiones que se enlazan

a CD20 destruyan directamente los linfocitos B usando una vía apoptótica clásica, como la vía de dependiente caspasa. Sin vernos limitados por una teoría, se espera que los escorpiones de enlace con CD20 directamente destruyan los linfocitos B a través de una vía de caspasa y SYK independiente que no produzca prominentemente fragmentación de ADN cromosómico, al menos no en la misma trama en que se produce la fragmentación durante la apoptosis dependiente de caspasa.

Ejemplo 19

Aplicaciones de los escorpiones

a. Actividad de los escorpiones *in vivo*

También se evaluó la actividad de los escorpiones usando un modelo de ratones. Las mediciones de la actividad de escorpiones *in vivo* implicaron la administración de 10-300 µg de escorpión y las determinaciones posteriores en series de tiempo de las concentraciones séricas de ese escorpión. Los resultados de estos estudios, presentados como curvas de concentración sérica para cada uno de dos escorpiones biespecíficos (es decir, S0033, un CD20xCD27 de escorpión y un CD20xCD37 de escorpión) de los estudios farmacocinéticos de tres semanas en los ratones se presentan en la Figura 40. Los datos de la Figura 40 muestran que se requirieron, al menos, 500 horas después de la administración para que las concentraciones séricas de cada uno de los dos escorpiones biespecíficos cayeran nuevamente a los niveles del punto de comparación. Por lo tanto, los escorpiones muestran la estabilidad sérica y semividas circulantes reproducibles sostenidas *in vivo*.

También se midió la eficacia de los escorpiones in vivo. Se utilizó un modelo de xenoinjerto de Ramos agresivo en experimentos paralelos con SMIP en comparación con controles de inmunoglobulina históricos. Las curvas de sobrevida de la Figura 41 revelan que la administración de 10 µg de escorpión biespecífico tenía influencia insignificante en la sobrevida, pero la administración de 100-300 µg tuvo un efecto

significativamente positivo sobre la sobrevida de los ratones que tenían xenoinjertos de Ramos.

b. Tratamientos combinados

Se contempla que los escorpiones encuentren aplicación en la prevención, tratamiento o alivio de un síntoma de una amplia variedad de afecciones que sufre el hombre, otros mamíferos u otros organismos. Por ejemplo, se esperaba que los escorpiones de enlace a CD20 resultaran de utilidad para tratar o para prevenir una variedad de enfermedades asociadas con un exceso de linfocitos B o con linfocitos B aberrantes. En realidad, cualquier enfermedad que se trate con un tratamiento que incluye la depleción de los linfocitos B sería susceptible del tratamiento con un escorpión de enlace con CD20. Además, los escorpiones, por ejemplo, los escorpiones de enlace con CD20, pueden usarse en las terapias de combinación con otras sustancias terapéuticas. Para ilustrar la factibilidad de una amplia variedad de terapias combinadas, el CD20xCD20 de escorpión monoespecífico (S0129) se administró a linfocitos B Su-DHL-6 en combinación con doxorubicina, vincristina o rapamicina. La doxorubicina es un veneno topoisomerasa II que interfiere con la bioquímica del ADN y pertenece a una clase de fármacos contemplados para la terapia anticancerígena. La rapamicina (Sirolimus) es un antibiótico macrólido que inhibe el inicio de la síntesis de proteínas y suprime el sistema inmune, y encuentra aplicación en el transplante de órganos como un antiproliferativo utilizado con stents coronarios para inhibir o prevenir la restenosis. La vincrstina es un alcaloide de vinca que inhibe la formación tubular y se utilizó para tratar el cáncer.

Los resultados experimentales mostrados en la Figura 61 se presentan como valores del índice de combinación para cada combinación sobre una variedad de rangos de efecto. Las interacciones del CD20xCD20 de escorpión monoespecífico S0129 son diferentes para cada clase de fármaco, mientras que con Rituxan® (RTXN) las formas de los trazados son similares. El efecto observado con doxorubicina en

elevadas concentraciones puede reflejar un cambio hacia el enlace monovalente. Los datos establecen que los escorpiones de enlace con CD20 pueden utilizarse en combinación con una variedad de otras sustancias terapéuticas y tales combinaciones serán evidentes par los expertos en el arte a partir de la presente divulgación.

Los expertos en el arte apreciarán variaciones en las estructuras de las moléculas de enlace multivalentes con función efectora, o escorpiones, en cuanto analicen la presente revelación, y dichas estructuras variantes se encuadran dentro del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de enlace multivalente monocatenaria con función efectora CARACTERIZADA porque comprende

a. un primer dominio de enlace derivado de una molécula de inmunoglobulina o una similar a inmunoglobulina;

b. una subregión constante que proporciona función efectora, la subregión constante de la inmunoglobulina está ubicada en el extremo C terminal del primer dominio de enlace;

c. un ligador de escorpión ubicado en el extremo C terminal de la subregión constante; y

d. un segundo dominio de enlace derivado de una molécula de inmunoglobulina o similar a inmunoglobulina, que se ubica en el extremo C terminal de la subregión constante;

con lo cual se ubica la subregión constante entre el primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace.

2. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque el primer dominio de enlace comprende una región ligera variable derivada de una primera inmunoglobulina y una región pesada variable derivada de una segunda inmunoglobulina.

3. La proteína según la reivindicación 2, CARACTERIZADA porque la primera inmunoglobulina y la segunda inmunoglobulina son la misma inmunoglobulina.

4. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque el segundo dominio de enlace comprende una región ligera variable derivada de una

primera inmunoglobulina y una región pesada variable derivada de una segunda inmunoglobulina.

5. La proteína según la reivindicación 4, CARACTERIZADA porque la primera inmunoglobulina y la segunda inmunoglobulina son la misma inmunoglobulina.

6. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque el primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace reconocen la misma diana molecular.

7. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque el primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace reconocen el mismo epítopo.

8. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque el primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace reconocen diferentes dianas moleculares en la misma célula eucariótica, célula procariótica, virus, portador u objeto.

9. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque el primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace reconocen dianas moleculares asociadas con células eucariotas, células procariotas, virus, portadores u objetos físicamente distintos.

10. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque al menos uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace reconocen al menos una diana molecular no asociada con una célula eucariótica, célula procariótica, virus, portador u objeto.

11. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque cada uno de: el primer dominio de enlace, el segundo dominio de enlace y la subregión constante, deriva de una inmunoglobulina humana.

12. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque al menos uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace reconoce una diana en una célula cancerígena.

13. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque al menos uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace reconoce una diana seleccionada del grupo que consta de un antígeno tumoral, una diana de los linfocitos B, un miembro de la superfamilia del receptor TNF, un miembro de la familia Hedgehog, una tirosina quinasa receptora, una molécula relacionada con proteoglicano, un miembro de la superfamilia TGF-beta, una molécula relacionada con Wnt, un ligando receptor, una diana de los linfocitos T, una diana de células dendríticas, una diana de células NK, una diana de células monocíticas/macrófagas y una diana de la angiogénesis.

14. La proteína según la reivindicación 13, CARACTERIZADA porque el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consta de: antígeno de carcinoma escamocelular 1; antígeno de carcinoma escamocelular 2; antígeno de carcinoma ovárico CA125; mucina 1, antígeno tumoral de CTCL se1-1 , antígeno tumoral de CTCL se14-3, antígeno tumoral de CTCL se20-4 , antígeno tumoral de CTCL se20-9, antígeno tumoral de CTCL se33-1, antígeno tumoral de CTCL se37-2, antígeno tumoral de CTCL , se57-1, antígeno tumoral de CTCL se89-1, antígeno de la membrana específico de la próstata, glucoproteína trofoblasto oncofetal 5T4, herpesvirus asociado con el sarcoma de Kaposi Orf73, antígeno MAGE-C1, antígeno MAGE-B1, antígeno MAGE-B2, antígeno MAGE-2, antígeno MAGE-4a, antígeno MAGE-4b, antígeno de cáncer de colon NY-CO-45 , antígeno de cáncer del pulmón NY-LU-12 variante A, antígeno de superficie asociado al cáncer, antígeno del adenocarcinoma ART1, antígeno del cáncer de cerebro-testículo paraneoplásico, antígeno ventral neurooncológico 2, gen del antígeno de carcinoma hepatocelular 520, antígeno asociado a tumor CO-029, antígeno asociado a tumor MAGE-X2, sarcoma sinovial, punto de ruptura X 2 [*X breakpoint 2*], antígeno de carcinoma escamocelular reconocido por linfocitos T, antígeno del cáncer de colon definido serológicamente 1, antígeno del cáncer de mama definido serológicamente NY-BR-15, antígeno del cáncer de mama definido serológicamente

NY-BR-16, cromogranina A; proteína secretora paratiroidea 1, DUPAN-2, CA 19-9, CA 72-4, CA 195 y L6.

15. La proteína según la reivindicación 13, CARACTERIZADA porque la diana de los linfocitos B se selecciona del grupo que consta de CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD38, CD39, CD40, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD78, CD79a/b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD89, CD98, CD126, CD127, CDw130, CD138 y CDw150.

16. La proteína según la reivindicación 13, CARACTERIZADA porque el miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral se selecciona del grupo que consta de 4-1BB/TNFRSF9, NGF R/TNFRSF16, BAFF R/TNFRSF13C, osteoprotegerina/TNFRSF11B, BCMA/TNFRSF17, OX40/TNFRSF4, CD27/TNFRSF7, RANK/TNFRSF11A, CD30/TNFRSF8, RELT/TNFRSF19L, CD40/TNFRSF5, TACI/TNFRSF13B, DcR3/TNFRSF6B, TNF RI/TNFRSF1A, DcTRAIL R1/TNFRSF23, TNF RII/TNFRSF1B, DcTRAIL R2/TNFRSF22, TRAIL R1/TNFRSF10A, DR3/TNFRSF25, TRAIL R2/TNFRSF10B, DR6/TNFRSF21, TRAIL R3/TNFRSF10C, EDAR, TRAIL R4/TNFRSF10D, Fas/TNFRSF6, TROY/TNFRSF19, GITR/TNFRSF18, TWEAK R/TNFRSF12, HVEM/TNFRSF14, XEDAR, linfotoxina beta R/TNFRSF3, ligando 4-1BB /TNFSF9, linfotoxina, APRIL/TNFSF13, linfotoxina beta/TNFSF3, BAFF/TNFSF13C, ligando OX40/TNFSF4, ligando CD27/TNFSF7, TL1A/TNFSF15, ligando CD30/TNFSF8, TNF-alfa/TNFSF1A, ligando CD40/TNFSF5, TNF-beta/TNFSF1B, EDA-A2, TRAIL/TNFSF10, ligando Fas/TNFSF6, TRANCE/TNFSF11, ligando GITR/TNFSF18, TWEAK/TNFSF12 y LIGHT/TNFSF14.

17. La proteína según la reivindicación 13, CARACTERIZADA porque el miembro de la familia Hedgehog se selecciona del grupo que consta de proteínas patched y smoothened.

18. La proteína según la reivindicación 13, CARACTERIZADA porque la tirosina quinasa receptora se selecciona del grupo que consta de Axl, FGF R4, C1q

R1/CD93, FGF R5, DDR1, Flt-3, DDR2, HGF R, Dtk, IGF-I R, EGF R, IGF-II R, Eph, INSRR, EphA1, insulina R/CD220, EphA2, M-CSF R, EphA3, Mer, EphA4, MSP R/Ron, EphA5, MuSK, EphA6, PDGF R alfa, EphA7, PDGF R beta, EphA8, Ret, EphB1, ROR1, EphB2, ROR2, EphB3, SCF R/c-kit, EphB4, Tie-1, EphB6, Tie-2, ErbB2, TrkA, ErbB3, TrkB, ErbB4, TrkC, FGF R1, VEGF R1/Flt-1, FGF R2, VEGF R2/Flk-1, FGF R3 y VEGF R3/Flt-4.

19. La proteína según la reivindicación 13, CARACTERIZADA porque la molécula relacionada a proteoglicano se selecciona del grupo que consta de proteoglicanos y sus reguladores.

20. La proteína según la reivindicación 13, CARACTERIZADA porque el miembro de la superfamilia de factores transformadores del crecimiento beta (TGF)-beta, se selecciona del grupo que consta de activina RIA/ALK-2, GFR alfa-1, activina RIB/ALK-4, GFR alfa-2, activina RIIA, GFR alfa-3, activina RIIB, GFR alfa-4, ALK-1, MIS RII, ALK-7, Ret, BMPR-IA/ALK-3, TGF-beta RI/ALK-5, BMPR-IB/ALK-6, TGF-beta RII, BMPR-II, TGF-beta RIIb, endoglina/CD105 y TGF-beta RIII.

21. La proteína según la reivindicación 13, CARACTERIZADA porque la molécula relacionada a Wnt se selecciona del grupo que consta de Frizzled-1, Frizzled-8, Frizzled-2, Frizzled-9, Frizzled-3, sFRP-1, Frizzled-4, sFRP-2, Frizzled-5, sFRP-3, Frizzled-6, sFRP-4, Frizzled-7, MFRP, LRP 5, LRP 6, Wnt-1, Wnt-8a, Wnt-3a, Wnt-10b, Wnt-4, Wnt-11, Wnt-5a, Wnt-9a y Wnt-7a.

22. La proteína según la reivindicación 13, CARACTERIZADA porque el ligando del receptor se selecciona del grupo que consta de: ligando 4-1BB/TNFSF9, linfotoxina, APRIL/TNFSF13, linfotoxina beta/TNFSF3, BAFF/TNFSF13C, ligando OX40/TNFSF4, ligando CD27/TNFSF7, TL1A/TNFSF15, ligando CD30/TNFSF8, TNF-alfa/TNFSF1A, ligando CD40/TNFSF5, TNF-beta/TNFSF1B, EDA-A2, TRAIL/TNFSF10, ligando Fas/TNFSF6, TRANCE/TNFSF11, ligando GITR/TNFSF18, TWEAK/TNFSF12, LIGHT/TNFSF14, anfiregulina, NRG1 isoforma GGF2, betacelulina, isoforma NRG1

SMDF, EGF, NRG1-alfa/HRG1-alfa, Epigen, NRG1-beta 1/HRG1-beta 1, epiregulina, TGF-alfa, HB-EGF, TMEFF1/tomoregulina-1, neuregulina-3, TMEFF2, IGF-I, IGF-II, insulina, activina A, activina B, activina AB, activina C, BMP-2, BMP-7, BMP-3, BMP-8, BMP-3b/GDF-10, BMP-9, BMP-4, BMP-15, BMP-5, decapentaplégico, BMP-6, GDF-1, GDF-8, GDF-3, GDF-9, GDF-5, GDF-11, GDF-6, GDF-15, GDF-7, artemina, neurturina, GDNF, persefina, TGF-beta, TGF-beta 2, TGF-beta 1, TGF-beta 3, LAP (TGF-beta 1), TGF-beta 5, TGF-beta latente 1, TGF-beta latente bp1, TGF-beta 1.2, Lefty, Nodal, MIS/AMH, FGF ácido, FGF-12, FGF básico, FGF-13, FGF-3, FGF-16, FGF-4, FGF-17, FGF-5, FGF-19, FGF-6, FGF-20, FGF-8, FGF-21, FGF-9, FGF-23, FGF-10, KGF/FGF-7, FGF-11, neuropilina-1, PlGF, neuropilina-2, PlGF-2, PDGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-B, VEGF-B, PDGF-C, VEGF-C, PDGF-D, VEGF-D y PDGF-AB.

23. La proteína según la reivindicación 13, CARACTERIZADA porque el receptor de los linfocitos T se selecciona del grupo que consta de 2B4/SLAMF4, IL-2 R alfa, 4-1BB/TNFRSF9, IL-2 R beta, ALCAM, B7-1/CD80, IL-4 R, B7-H3, BLAME/SLAMF8, BTLA, IL-6 R, CCR3, IL-7 R alfa, CCR4, CXCR1/IL-8 RA, CCR5, CCR6, IL-10 R alfa, CCR7, IL-10 R beta, CCR8, IL-12 R beta 1, CCR9, IL-12 R beta 2, CD2, IL-13 R alfa 1, IL-13, CD3, CD4, ILT2/CD85j, ILT3/CD85k, ILT4/CD85d, ILT5/CD85a, integrina alfa 4/CD49d, CD5, integrina alfa E/CD103, CD6, integrina alfa M/CD11b, CD8, integrina alfa X/CD11c, integrina beta 2/CD18, KIR/CD158, CD27/TNFRSF7, KIR2DL1, CD28, KIR2DL3, CD30/TNFRSF8, KIR2DL4/CD158d, CD31/PECAM-1, KIR2DS4, ligando CD40/TNFSF5, LAG-3, CD43, LAIR1, CD45, LAIR2, CD83, leucotrieno B4 R1, CD84/SLAMF5, NCAM-L1, CD94, NKG2A, CD97, NKG2C, CD229/SLAMF3, NKG2D, CD2F-10/SLAMF9, NT-4, CD69, NTB-A/SLAMF6, cadena gamma común/IL-2 R gamma, osteopontina, CRACC/SLAMF7, PD-1, CRTAM, PSGL-1, CTLA-4, RANK/TNFRSF11A, CX3CR1, CX3CL1, L-selectina, CXCR3, SIRP beta 1, CXCR4, SLAM, CXCR6, TCCR/WSX-1, DNAM-1, timopoyetina, EMMPRIN/CD147, TIM-1, EphB6, TIM-2, Fas/TNFRSF6, TIM-3, ligando Fas/TNFSF6,

TIM-4, Fc gamma RIII/CD16, TIM-6, GITR/TNFRSF18, TNF RI/TNFRSF1A, granulisina, TNF RII/TNFRSF1B, HVEM/TNFRSF14, TRAIL R1/TNFRSF10A, ICAM-1/CD54, TRAIL R2/TNFRSF10B, ICAM-2/CD102, TRAIL R3/TNFRSF10C, IFN-gamma R1, TRAIL R4/TNFRSF10D, IFN-gamma R2, TSLP, IL-1 RI y TSLP R.

24. La proteína según la reivindicación 13, CARACTERIZADA porque el receptor de las células NK se selecciona del grupo que consta de 2B4/SLAMF4, KIR2DS4, CD155/PVR, KIR3DL1, CD94, LMIR1/CD300A, CD69, LMIR2/CD300c, CRACC/SLAMF7, LMIR3/CD300LF, DNAM-1, LMIR5/CD300LB, Fc épsilon RII, LMIR6/CD300LE, Fc gamma RI/CD64, MICA, Fc gamma RIIB/CD32b, MICB, Fc gamma RIIC/CD32c, MULT-1, Fc gamma RIIA/CD32a, Nectina-2/CD112, Fc gamma RIII/CD16, NKG2A, FcRH1/IRTA5, NKG2C, FcRH2/IRTA4, NKG2D, FcRH4/IRTA1, NKp30, FcRH5/IRTA2, NKp44, similar al receptor Fc 3/CD16-2, NKp46/NCR1, NKp80/KLRF1, NTB-A/SLAMF6, Rae-1, Rae-1 alfa, Rae-1 beta, Rae-1 delta, H60, Rae-1 épsilon, ILT2/CD85j, Rae-1 gamma, ILT3/CD85k, TREM-1, ILT4/CD85d, TREM-2, ILT5/CD85a, TREM-3, KIR/CD158, TREML1/TLT-1, KIR2DL1, ULBP-1, KIR2DL3, ULBP-2, KIR2DL4/CD158d y ULBP-3.

25. La proteína según la reivindicación 13, CARACTERIZADA porque el receptor de las células monocíticas/macrófagas se selecciona del grupo que consta de: B7-1/CD80, ILT4/CD85d, B7-H1, ILT5/CD85a, cadena beta común, integrina alfa 4/CD49d, BLAME/SLAMF8, integrina alfa X/CD11c, CCL6/C10, integrina beta 2/CD18, CD155/PVR, integrina beta 3/CD61, CD31/PECAM-1, latexina, CD36/SR-B3, leucotrieno B4 R1, CD40/TNFRSF5, LIMPII/SR-B2, CD43, LMIR1/CD300A, CD45, LMIR2/CD300c, CD68, LMIR3/CD300LF, CD84/SLAMF5, LMIR5/CD300LB, CD97, LMIR6/CD300LE, CD163, LRP-1, CD2F-10/SLAMF9, MARCO, CRACC/SLAMF7, MD-1, ECF-L, MD-2, EMMPRIN/CD147, MGL2, endoglina/CD105, osteoactivina/GPNMB, Fc gamma RI/CD64, osteopontina, Fc gamma RIIB/CD32b, PD-L2, Fc gamma RIIC/CD32c, Siglec-3/CD33, Fc gamma RIIA/CD32a, SIGNR1/CD209, Fc gamma

289

RIII/CD16, SLAM, GM-CSF R alfa, TCCR/WSX-1, ICAM-2/CD102, TLR3, IFN-gamma R1, TLR4, IFN-gamma R2, TREM-1, IL-1 RII, TREM-2, ILT2/CD85j, TREM-3, ILT3/CD85k, TREML1/TLT-1, 2B4/SLAMF4, IL-10 R alfa, ALCAM, IL-10 R beta, aminopeptidasa N/ANPEP, ILT2/CD85j, cadena beta común, ILT3/CD85k, C1q R1/CD93, ILT4/CD85d, CCR1, ILT5/CD85a, CCR2, integrina alfa 4/CD49d, CCR5, integrina alfa M/CD11b, CCR8, integrina alfa X/CD11c, CD155/PVR, integrina beta 2/CD18, CD14, integrina beta 3/CD61, CD36/SR-B3, LAIR1, CD43, LAIR2, CD45, leucotrieno B4 R1, CD68, LIMPII/SR-B2, CD84/SLAMF5, LMIR1/CD300A, CD97, LMIR2/CD300c, CD163, LMIR3/CD300LF, factor de coagulación III/factor tisular, LMIR5/CD300LB, CX3CR1, CX3CL1, LMIR6/CD300LE, CXCR4, LRP-1, CXCR6, M-CSF R, DEP-1/CD148, MD-1, DNAM-1, MD-2, EMMPRIN/CD147, MMR, endoglina/CD105, NCAM-L1, Fc gamma RI/CD64, PSGL-1, Fc gamma RIII/CD16, RP105, G-CSF R, L-selectina, GM-CSF R alfa, Siglec-3/CD33, HVEM/TNFRSF14, SLAM, ICAM-1/CD54, TCCR/WSX-1, ICAM-2/CD102, TREM-1, IL-6 R, TREM-2, CXCR1/IL-8 RA, TREM-3 y TREML1/TLT-1.

26. La proteína según la reivindicación 13, CARACTERIZADA porque el receptor de las células dendríticas se selecciona del grupo que consta de: CD36/SR-B3, LOX-1/SR-E1, CD68, MARCO, CD163, SR-AI/MSR, CD5L, SREC-I, CL-P1/COLEC12, SREC-II, LIMPII/SR-B2, RP105, TLR4, TLR1, TLR5, TLR2, TLR6, TLR3, TLR9, ligando 4-1BB/TNFSF9, IL-12/IL-23 p40, 4-amino-1,8-naftalimida, ILT2/CD85j, CCL21/6Cquina, ILT3/CD85k, 8-oxo-dG, ILT4/CD85d, 8D6A, ILT5/CD85a, A2B5, integrina alfa 4/CD49d, Aag, integrina beta 2/CD18, AMICA, langerina, B7-2/CD86, leucotrieno B4 R1, B7-H3, LMIR1/CD300A, BLAME/SLAMF8, LMIR2/CD300c, C1q R1/CD93, LMIR3/CD300LF, CCR6, LMIR5/CD300LB, CCR7, LMIR6/CD300LE, CD40/TNFRSF5, MAG/Siglec-4a, CD43, MCAM, CD45, MD-1, CD68, MD-2, CD83, MDL-1/CLEC5A, CD84/SLAMF5, MMR, CD97, NCAM-L1, CD2F-10/SLAMF9, osteoactivina/GPNMB, Chem 23, PD-L2, CLEC-1, RP105, CLEC-2, Siglec-2/CD22, CRACC/SLAMF7, Siglec-3/CD33, DC-SIGN,

290

Siglec-5, DC-SIGNR/CD299, Siglec-6, DCAR, Siglec-7, DCIR/CLEC4A, Siglec-9, DEC-205, Siglec-10, dectina-1/CLEC7A, Siglec-F, dectina-2/CLEC6A, SIGNR1/CD209, DEP-1/CD148, SIGNR4, DLEC, SLAM, EMMPRIN/CD147, TCCR/WSX-1, Fc gamma RI/CD64, TLR3, Fc gamma RIIB/CD32b, TREM-1, Fc gamma RIIC/CD32c, TREM-2, Fc gamma RIIA/CD32a, TREM-3, Fc gamma RIII/CD16, TREML1/TLT-1, ICAM-2/CD102 y vaniloide R1.

27. La proteína según la reivindicación 13, CARACTERIZADA porque la diana de angiogénesis se selecciona del grupo que consta de: angiopoyetina-1, similar a angiopoyetina 2, angiopoyetina-2, similar a angiopoyetina 3, angiopoyetina-3, similar a angiopoyetina 7/CDT6, angiopoyetina-4, Tie-1, similar a angiopoyetina 1, Tie-2, Angiogenina, iNOS, factor de coagulación III/factor tisular, nNOS, CTGF/CCN2, NOV/CCN3, DANCE, OSM, EDG-1, Plfr, EG-VEGF/PK1, proliferina, endostatina, ROBO4, eritropoyetina, trombospondina-1, quininostatina, trombospondina-2, MFG-E8, trombospondina-4, óxido nítrico, VG5Q, eNOS, EphA1, EphA5, EphA2, EphA6, EphA3, EphA7, EphA4, EphA8, EphB1, EphB4, EphB2, EphB6, EphB3, efrina-A1, efrina-A4, efrina-A2, efrina-A5, efrina-A3, efrina-B1, efrina-B3, efrina-B2, FGF ácido, FGF-12, FGF basic, FGF-13, FGF-3, FGF-16, FGF-4, FGF-17, FGF-5, FGF-19, FGF-6, FGF-20, FGF-8, FGF-21, FGF-9, FGF-23, FGF-10, KGF/FGF-7, FGF-11, FGF R1, FGF R4, FGF R2, FGF R5, FGF R3, neuropilina-1, neuropilina-2, semaforina 3A, semaforina 6B, semaforina 3C, semaforina 6C, semaforina 3E, semaforina 6D, semaforina 6A, semaforina 7A, MMP, MMP-11, MMP-1, MMP-12, MMP-2, MMP-13, MMP-3, MMP-14, MMP-7, MMP-15, MMP-8, MMP-16/MT3-MMP, MMP-9, MMP-24/MT5-MMP, MMP-10, MMP-25/MT6-MMP, TIMP-1, TIMP-3, TIMP-2, TIMP-4, ACE, IL-13 R alfa 1, IL-13, C1q R1/CD93, integrina alfa 4/CD49d, VE-caderina, integrina beta 2/CD18, CD31/PECAM-1, KLF4, CD36/SR-B3, LYVE-1, CD151, MCAM, CL-P1/COLEC12, nectina-2/CD112, factor de coagulación III/factor tisular, E-selectina, D6, P-selectina, DC-SIGNR/CD299, SLAM, EMMPRIN/CD147, Tie-2, endoglina/CD105, TNF RI/TNFRSF1A, EPCR, TNF

RII/TNFRSF1B, eritropoyetina R, TRAIL R1/TNFRSF10A, ESAM, TRAIL R2/TNFRSF10B, FABP5, VCAM-1, ICAM-1/CD54, VEGF R2/Flk-1, ICAM-2/CD102, VEGF R3/Flt-4, IL-1 RI y VG5Q.

28. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque al menos uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace específicamente se enlaza a una diana seleccionada del grupo que consta de antígeno de membrana específico de la próstata (folato hidrolasa 1), receptor del factor de crecimiento epidérmico, receptor de productos terminales de glicación avanzada, IL-17 A, IL-17 F, P19 (IL23A e IL12B), Dickkopf-1, NOTCH1, NG2, IgHE, IL-22R, IL-21, oligómeros beta-amiloide, proteína del precursor beta-amiloide, receptor NOGO (RTN4R), proteína relacionada al receptor de liproteínas de baja densidad 5, IL-4, miostatina, antígeno muy tardío 4 e IGF-1R.

29. La proteína según la reivindicación 12, CARACTERIZADA porque la célula cancerígena es una célula hematopoyética transformada.

30. La proteína según la reivindicación 29, CARACTERIZADA porque al menos uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace reconoce una diana seleccionada del grupo que consta de una diana de los linfocitos B, una diana de los linfocitos T, una diana de células dendríticas o una diana de células NK.

31. La proteína según la reivindicación 29, CARACTERIZADA porque al menos uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace reconoce una diana seleccionada del grupo que consta de CD5, CD10, CD11c, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27, CD30, CD38, CD45, CD70, CD80, CD86, CD103, IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4, IRTA5, B-B2, B-B8, y un receptor del antígeno de los linfocitos B.

32. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque comprende una secuencia seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 103, 105, 107, 109, 332, 333, 334 y 345.

292

33. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consta de las SEQ ID NOS: 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364 y 365.

34. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la subregión constante reconoce un receptor F_C de células efectoras.

35. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la subregión constante reconoce una proteína de la superficie de células efectoras que se selecciona del grupo que consta de CD16, CD32a, CD32b, CD64, CD89, FcεR1, FcRn y pIgR.

36. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la subregión constante comprende un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3}.

37. La proteína según la reivindicación 36, CARACTERIZADA porque el dominio C_{H3} está truncado, y comprende una secuencia C terminal que se selecciona del grupo que consta de las SEQ ID NOS: 366, 367, 368, 369, 370 y 371.

38. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque el ligador de escorpión deriva de una bisagra de inmunoglobulina.

39. La proteína según la reivindicación 38, CARACTERIZADA porque el ligador de escorpión tiene un número reducido, que no es cero, de cisteínas respecto de la bisagra desde las cuales deriva el ligador de escorpión, y donde una cisteína corresponde a la cisteína de la bisagra del extremo N terminal de la bisagra de inmunoglobulina.

40. La proteína según la reivindicación 39, CARACTERIZADA porque el ligador de escorpión deriva de una región de bisagra de la IgG1 y donde el ligador comprende una o dos cisteínas, donde también el ligador retiene la cisteína que corresponde a una cisteína de bisagra del extremo N terminal de la región de bisagra de la IgG1.

41. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque el ligador de escorpión deriva de la región de tallo de una C-lectina.

42. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque el ligador de escorpión comprende una secuencia seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID NOS: 373, 374, 375, 376 y 377.

43. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque el ligador de escorpión comprende una secuencia seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID NOS: 351, 352, 353 y 354.

44. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque también comprende un ligador de, al menos, alrededor de 5 aminoácidos unidos a la subregión constante y unidos al primer dominio de enlace, de ese modo ubicando el ligador entre la subregión constante y el primer dominio de enlace.

45. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la afinidad de enlace de al menos uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace es menor que 10^{-9} M.

46. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la afinidad de enlace de al menos uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace es de 10^{-6} M, como mínimo.

47. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la función efectora se selecciona del grupo que consta de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

48. La proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la semivida *in vivo* de la proteína es de 28 horas, como mínimo, en un ser humano.

49. Una composición farmacéutica CARACTERIZADA porque comprende la proteína según la reivindicación 1 y un adyuvante, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

50. Un ácido nucleico CARACTERIZADO porque codifica una proteína según la reivindicación 1.

51. Un vector CARACTERIZADO porque comprende un ácido nucleico según la reivindicación 50.

52. Una célula hospedante CARACTERIZADA porque comprende un vector según la reivindicación 51.

53. Un método para producir la proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque comprende:

a. introducir un ácido nucleico que codifica la proteína según la reivindicación 1 en una célula hospedante; e

b. incubar la célula hospedante en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína, con lo cual se expresa la proteína en un nivel de 1 mg/ml como mínimo.

54. El método según la reivindicación 53, CARACTERIZADO porque también comprende aislar la proteína.

55. El método según la reivindicación 53, CARACTERIZADO porque la célula hospedante se selecciona del grupo que consta de una célula VERO, una célula HeLa, una célula CHO, una célula COS, una célula W138, una célula BHK, una célula HepG2, una célula 3T3, una célula RIN, una célula MDCK, una célula A549, una célula PC12, una célula K562, una célula HEK293, una célula N, una célula *Spodoptera frugiperda,* una célula *Saccharomyces cerevisiae*, una célula *Pichia pastoris*, una célula fúngica y una célula bacteriana.

56. Un método para producir un ácido nucleico que codifica la proteína según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque comprende:

a. enlazar de manera covalente el extremo 3' de un polinucleótido que codifica un primer dorninio de enlace derivado de una región variable de la inmunoglobulina al extremo 5' de un polinucleótido que codifica una subregión constante;

b. enlazar de manera covalente el extremo 5' de un polinucleótido que codifica un ligador de escorpión al extremo 3' del polinucleótido que codifica la subregión constante; y

c. enlazar de manera covalente el extremo 5' de un polinucleótido que codifica un segundo dominio de enlace derivado de una región variable de la inmunoglobulina al extremo 3' del polinucleótido que codifica el ligador de escorpión;

con lo cual se genera un ácido nucleico que codifica una proteína de enlace multivalente con función efectora.

57. El método según la reivindicación 56, CARACTERIZADO porque el polinucleótido que codifica un primer dominio de enlace comprende una secuencia que se selecciona del grupo, que consta de la SEQ ID NO: 1 (región variable anti-CD20), SEQ ID NO: 3 (región variable anti-CD28, con orientación V_L-V_H) y SEQ ID NO: 5 (región variable anti-CD28, con orientación V_H-V_L).

58. El método según la reivindicación 56, CARACTERIZADO porque además comprende un polinucleótido ligador insertado entre el polinucleótido que codifica un primer dominio de enlace y el polinucleótido que codifica una subregión constante, el polinucleótido ligador codifica un ligador peptídico de 5 aminoácidos, como mínimo.

59. El método según la reivindicación 56, CARACTERIZADO porque además comprende un polinucleótido ligador insertado entre el polinucleótido que codifica una subregión constante y el polinucleótido que codifica un segundo dominio de enlace, el polinucleótido ligador codifica un ligador peptídico de 5 aminoácidos, como mínimo.

60. Un método para inducir daño a una célula diana CARACTERIZADO porque comprende poner en contacto una célula diana con una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína según la reivindicación 1.

61. El método según la reivindicación 60, CARACTERIZADO porque la célula diana se pone en contacto *in vivo* mediante la administración de la proteína a un organismo que lo necesita.

62. Un método para tratar un trastorno proliferativo celular, CARACTERIZADO porque comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína según la reivindicación 1 a un organismo que lo necesita.

63. El método según la reivindicación 62, CARACTERIZADO porque el trastorno se selecciona del grupo que consta de cáncer, trastorno auto-inmunitario, infección por virus del sarcoma de Rous e inflamación.

64. El método según la reivindicación 62, CARACTERIZADO porque la proteína se administra mediante la expresión *in vivo* de un ácido nucleico que codifica la proteína según la reivindicación 1.

65. El método según la reivindicación 62, CARACTERIZADO porque la proteína se administra por la vía seleccionada del grupo que consta de inyección intravenosa, inyección intraarterial, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intraperitoneal e inyección tisular directa.

66. Un método para aliviar un síntoma asociado con un trastorno proliferativo celular, CARACTERIZADO porque comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína según la reivindicación 1 a un organismo que lo necesita.

67. El método según la reivindicación 66, CARACTERIZADO porque el síntoma se selecciona del grupo que consta de dolor, calor, hinchazón y rigidez de las articulaciones.

297

68. Un método para tratar una infección asociada con un agente infeccioso CARACTERIZADO porque comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína según la reivindicación 1 a un paciente que lo necesita, donde la proteína comprende un dominio de enlace que específicamente enlaza una molécula diana del agente infeccioso.

69. Un método para aliviar un síntoma de una infección asociada con un agente infeccioso CARACTERIZADO porque comprende la administración de una cantidad eficaz de la proteína según la reivindicación 1 a un paciente que lo necesita, donde la proteína comprende un dominio de enlace que específicamente enlaza una molécula diana del agente infeccioso.

70. Un método para reducir el riesgo de infección que se atribuye a un agente infeccioso CARACTERIZADO porque comprende administrar una cantidad profilácticamente eficaz de la proteína según la reivindicación 1, a un paciente que está en riesgo de padecer la infección, donde la proteína comprende un dominio de enlace que específicamente enlaza una molécula diana del agente infeccioso.

71. Un kit CARACTERIZADO porque comprende la proteína según la reivindicación 1 y un conjunto de instrucciones para administrar la proteína para tratar un trastorno de la proliferación de células o para aliviar un síntoma del trastorno de la proliferación de células.

72. La proteína de enlace multivalente monocatenaria según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque al menos uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace enlaza específicamente un antígeno seleccionado del grupo que consta de CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 y un péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad.

73. La proteína según la reivindicación 72, CARACTERIZADA porque el primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace específicamente se enlazan a la molécula CD20.

74. La proteína según la reivindicación 73, CARACTERIZADA porque el otro dominio de enlace enlaza específicamente un antígeno seleccionado del grupo que consta de CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 y un péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad.

75. La proteína según la reivindicación 72, CARACTERIZADA porque uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace específicamente se enlaza a la molécula CD79b.

76. La proteína según la reivindicación 75, CARACTERIZADA porque el otro dominio de enlace enlaza específicamente un antígeno seleccionado del grupo que consta de CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 y un péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad.

77. La proteína según la reivindicación 72, CARACTERIZADA porque uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace específicamente se enlaza a un péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad.

78. La proteína según la reivindicación 77, CARACTERIZADA porque el otro dominio de enlace enlaza específicamente un antígeno seleccionado del grupo que consta de CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 y un péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad.

79. La proteína según la reivindicación 72, CARACTERIZADA porque uno del primer dominio de enlace y el segundo dominio de enlace específicamente se enlaza a la molécula CD22.

80. La proteína según la reivindicación 79, CARACTERIZADA porque el otro dominio de enlace enlaza específicamente un antígeno seleccionado del grupo que consta de CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD30, CD37, CD40, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 y un péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad.

81. La proteína según la reivindicación 72, CARACTERIZADA porque la proteína tiene un efecto sinérgico sobre el comportamiento de una célula diana respecto de la suma de los efectos de cada uno de los dominios de enlace, y donde la proteína comprende un par de dominios de enlace, que específicamente reconoce un par de antígenos seleccionados del grupo que consta de CD20-CD19, CD20-CD21, CD20-CD22, CD20-CD40, CD20-CD79a, CD20-CD79b y CD20-CD81.

82. La proteína según la reivindicación 72, CARACTERIZADA porque la proteína tiene un efecto acumulativo sobre el comportamiento de una célula diana respecto de la suma de los efectos de cada uno de los dominios de enlace, y donde la proteína comprende un par de dominios de enlace, que específicamente reconoce un par de antígenos seleccionados del grupo que consta de CD20-CD23, CD20-CD30, CD20-CD37, CD20-CD70, CD20-CD80, CD20-CD86, CD79b-CD37, CD79b-CD81, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD30 y péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD72.

83. La proteína según la reivindicación 72, CARACTERIZADA porque la proteína tiene un efecto inhibidor sobre el comportamiento de la célula diana respecto de la suma de los efectos de cada dominio de enlace, y donde la proteína comprende un par de dominios de enlace que específicamente reconoce el par de antígenos seleccionados del grupo que consta de CD20-péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad, CD79b-CD19, CD79b-CD20, CD79b-CD21, CD79b-CD22, CD79b-CD23, CD79b-CD30, CD79b-CD40, CD79b-CD70, CD79b-CD72, CD79b-CD79a, CD79b-CD80, CD79b-CD86, CD79b-péptido de clase II del complejo principal

de histocompatibilidad, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD19, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD20, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD21, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD22, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD23, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD37, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD40, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD70, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD79a, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD79b, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD80, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD81, péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad-CD86, CD22-CD19, CD22-CD40, CD22-CD79b, CD22-CD86 y CD22-péptido de clase II del complejo principal de histocompatibilidad.

84. Un método para identificar al menos uno de los dominios de enlace de la molécula de enlace multivalente, según la reivindicación 1 CARACTERIZADO porque comprende:

(a) poner en contacto un anticuerpo anti-isotípico con un anticuerpo que reconoce específicamente un primer antígeno y un anticuerpo que reconoce específicamente un segundo antígeno;

(b) también poner en contacto una diana que comprende al menos uno de los antígenos con la composición del paso (a); y

(c) medir una actividad de la diana, donde la actividad se usa para identificar al menos uno de los dominios de enlace de la molécula de enlace multivalente.

85. El método según la reivindicación 84, CARACTERIZADO porque la diana es una célula enferma.

86. El método según la reivindicación 60, CARACTERIZADO porque la proteína de enlace multivalente monocatenaria provoca una cantidad sinérgica de daño a la célula diana comparado con la suma del daño provocado por un primer anticuerpo que comprende el primer dominio de enlace pero no el segundo dominio de enlace, y un segundo anticuerpo que comprende el segundo dominio de enlace pero no el primer dominio de enlace.

87. El método según la reivindicación 86, CARACTERIZADO porque la proteína de enlace multivalente monocatenaria comprende un par de dominios de enlace, que específicamente reconoce un par de antígenos seleccionados del grupo que consta de: CD19/CD20, CD20/CD21, CD20/CD22, CD20/CD40, CD20/CD79a, CD20/CD79b, CD20/CD81, CD21/CD79b, CD37/CD79b, CD79b/CD81, CD19/CL II, CD20/CL II, CD30/CL II, CD37/CL II, CD72/CL II y CD79b/CL II.

88. El método según la reivindicación 60, CARACTERIZADO porque la proteína de enlace multivalente monocatenaria provoca una cantidad inhibida de daño a la célula diana comparado con la suma del daño provocado por un primer anticuerpo que comprende el primer dominio de enlace pero no el segundo dominio de enlace, y un segundo anticuerpo que comprende el segundo dominio de enlace pero no el primer dominio de enlace.

89. El método según la reivindicación 88, CARACTERIZADO porque la proteína de enlace multivalente monocatenaria comprende un par de dominios de enlace, que específicamente reconoce un par de antígenos seleccionados del grupo que consta de CD20/CL II, CD21/CD79b, CD22/CD79b, CD40/CD79b, CD70/CD79b, CD72/CD79b, CD79a/CD79b, CD79b/CD80, CD79b/CD86, CD21/CL II, CD22/CL II, CD23/CL II, CD40/CL II, CD70/CL II, CD80/CL II, CD86/CL II, CD19/CD22, CD20/CD22, CD21/CD22, CD22/CD23, CD22/CD30, CD22/CD37, CD22/CD40, CD22/CD70, CD22/CD72, CD22/79a, CD22/79b, CD22/CD80, CD22/CD86 y CD22/CL II.

90. El método según la reivindicación 60, CARACTERIZADO porque también comprende una pluralidad de proteínas de enlace multivalentes monocatenarias.

91. El método según la reivindicación 90, CARACTERIZADO porque un dominio de enlace de una primera proteína de enlace multivalente monocatenaria y un dominio de enlace de una segunda proteína de enlace multivalente monocatenaria inducen una cantidad sinérgica de daño a la célula diana

92. El método según la reivindicación 90, CARACTERIZADO porque un dominio de enlace de una primera proteína de enlace multivalente monocatenaria y un dominio de enlace de una segunda proteína de enlace multivalente monocatenaria inducen una cantidad inhibida de daño a la célula diana

93. Una composición CARACTERIZADA porque comprende una pluralidad de proteínas de enlace multivalentes monocatenarias, según la reivindicación 1.

94. La composición según la reivindicación 93, CARACTERIZADA porque un dominio de enlace de una primera proteína de enlace multivalente monocatenaria y un dominio de enlace de una segunda proteína de enlace multivalente monocatenaria tienen capacidad de inducir una cantidad sinérgica de daño a la célula diana

95. La composición según la reivindicación 93, CARACTERIZADA porque un dominio de enlace de una primera proteína de enlace multivalente monocatenaria y un dominio de enlace de una segunda proteína de enlace multivalente monocatenaria tienen capacidad de inducir una cantidad acumulativa de daño a la célula diana

96. La composición según la reivindicación 93, CARACTERIZADA porque un dominio de enlace de una primera proteína de enlace multivalente monocatenaria y un dominio de enlace de una segunda proteína de enlace multivalente monocatenaria tienen capacidad de inducir una cantidad inhibida de daño a la célula diana

97. Una composición farmacéutica CARACTERIZADA porque comprende la composición según la reivindicación 93 y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

98. Un kit CARACTERIZADO porque comprende la composición según la reivindicación 93 y un conjunto de instrucciones para administrar la composición para dañar una célula diana.

RESUMEN

Se proporcionan péptidos de enlace multivalentes, incluso péptidos de enlace biespecíficos, que tienen función efectora de la inmunoglobulina, además de ácidos nucleicos codificantes, vectores y células hospedantes, al igual que los métodos para elaborar tales péptidos y métodos para utilizar tales péptidos en el tratamiento preventivo o curativo de una variedad de enfermedades, trastornos o afecciones, o bien para aliviar al menos un síntoma asociado con tales enfermedades, trastornos o afecciones.



FIG. 1

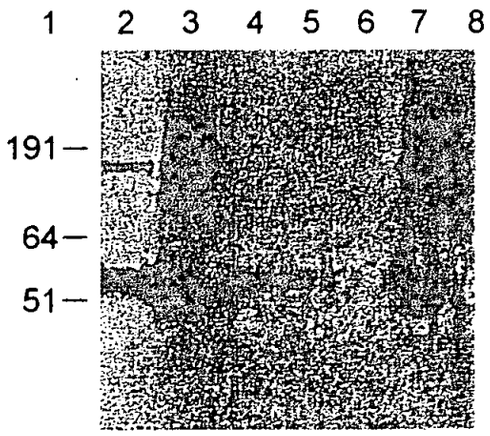
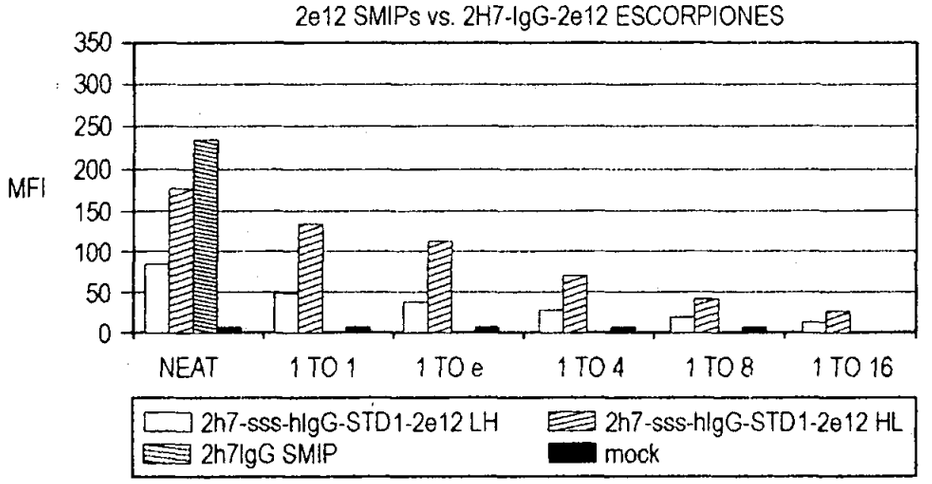


FIG. 2

FIG. 3

ENLACES DE PROTEINA EXPRESADOS EN SOBRENADANTES COS A CELULAS QUE EXPRESAN ANTIGENOS OBJETIVOS

A. ENLACES DE SOBRENADANTES A CELULAS WIL-2S CELLS
2e12 SMIPs vs. 2H7-IgG-2e12 ESCORPIONES



B.ENLACE DE SOBRENADANTES COS A CELULAS CD28 OHO
2e12 SMIPs vs. 2H7-2e12 ESCORPIONES

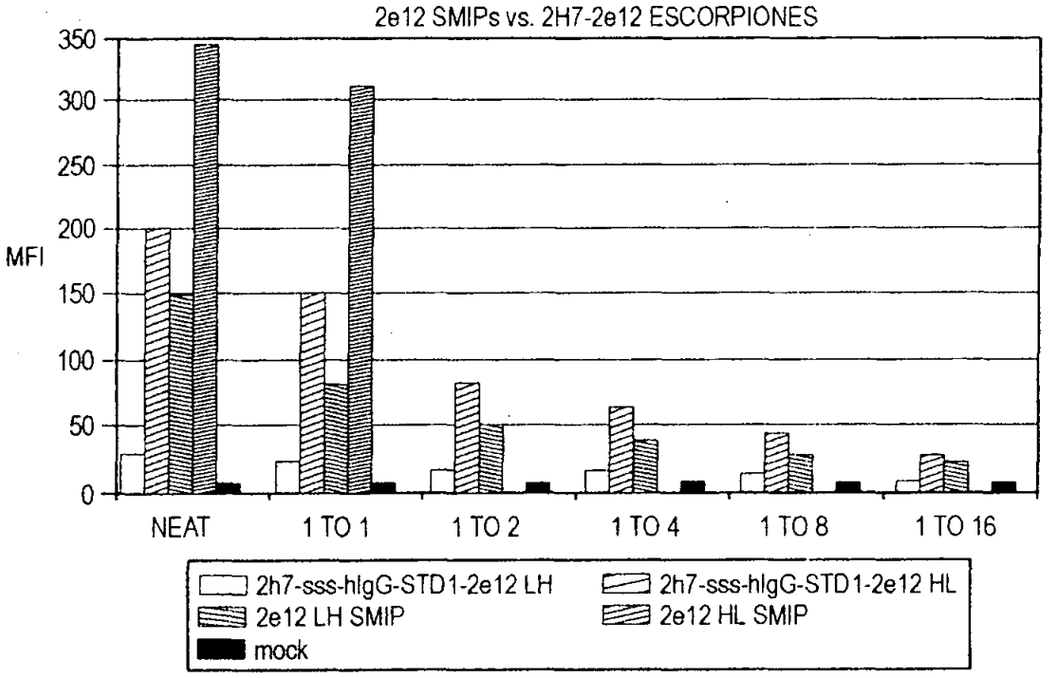


FIG. 4

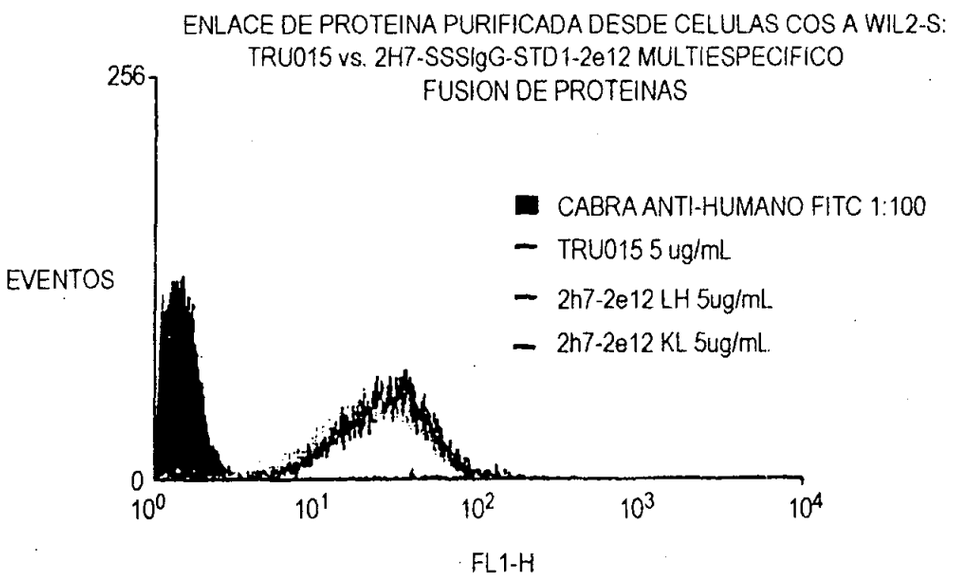
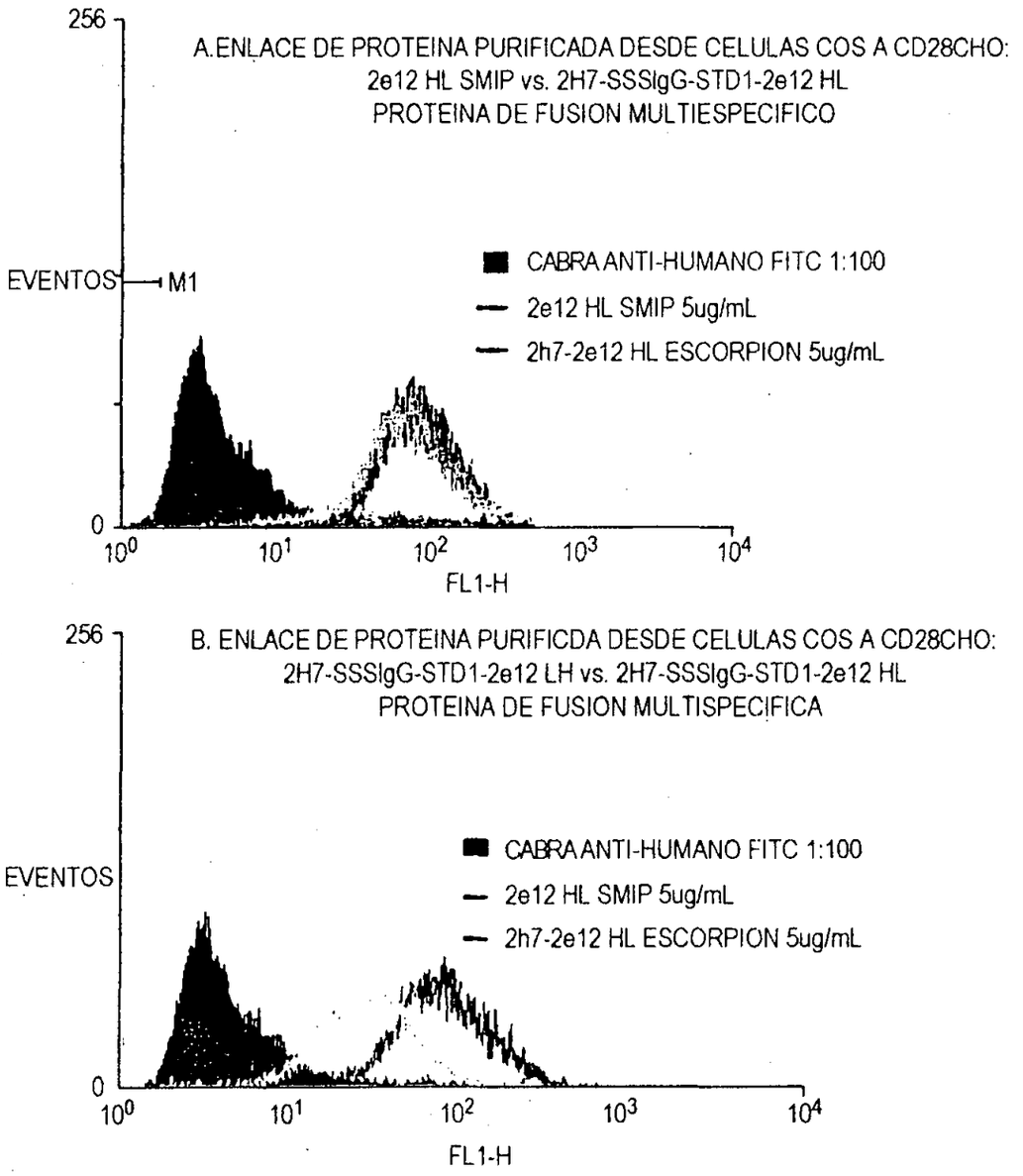

ENLACE DE PROTEINA PURIFICADA DESDE CELULAS COS A WIL2-S:
TRU015 vs. 2H7-SSSIgG-STD1-2e12 MULTIESPECIFICO
FUSION DE PROTEINAS
256
EVENTOS
0
CABRA ANTI-HUMANO FITC 1:100
TRU015 5 ug/mL
2h7-2e12 LH 5ug/mL
2h7-2e12 KL 5ug/mL
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL1-H

FIG. 5


256
A.ENLACE DE PROTEINA PURIFICADA DESDE CELULAS COS A CD28CHO:
2e12 HL SMIP vs. 2H7-SSSIgG-STD1-2e12 HL
PROTEINA DE FUSION MULTIESPECIFICO
EVENTOS
M1
CABRA ANTI-HUMANO FITC 1:100
2e12 HL SMIP 5ug/mL
2h7-2e12 HL ESCORPION 5ug/mL
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL1-H
256
B. ENLACE DE PROTEINA PURIFICDA DESDE CELULAS COS A CD28CHO:
2H7-SSSIgG-STD1-2e12 LH vs. 2H7-SSSIgG-STD1-2e12 HL
PROTEINA DE FUSION MULTISPECIFICA
EVENTOS
CABRA ANTI-HUMANO FITC 1:100
2e12 HL SMIP 5ug/mL
2h7-2e12 HL ESCORPION 5ug/mL
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL1-H

310

FIG. 6A

TABLA IDENTIFICANDO ELEMENTOS FUNCIONALES DE PROTEINAS DE FUSION MULTISPECIFICA



BD1 Dominio de Enlace 1	Ligador 1	EFD Bisagra y Dominio Efector	Ligador 2 ID	Ligador Longitud (aa) Ligador Más Lugar R.	CH3 COOH	Ligador 2 Secuencia (-lugar de restricción)	Secuencia de la Fusion con BD2 (L2 RS– QVQ 2e12)	BD2 Dominio de enlace 2
2H7 V_L-V_H	Unión alterada hIgGl ccc->sss	hIgGl-CH2-CH3	STD	20	PGK	NYGGGGSGGGGSGGGGSG	NS QVQ	2e12 V_H-V_L
2H7 V_L-V_H	Unión alterada hIgGl ccc->sss	hIgGl-CH2-CH3	STD2	38	PGK	NYGGGGSGGGGSGGGGSG NYGGGGSGGGGSGGGGSG	NS QVQ	2e12 V_H-V_L
2H7 V_L-V_H	Unión alterada hIgGl ccc->sss	hIgGl-CH2-CH3	H1 L1=2e12 V_L-V_H	2 (RS)	PGK	–	NS QVQ	2e12 V_H-V_L
2H7 V_L-V_H	Unión alterada hIgGl ccc->sss	hIgGl-CH2-CH3	H2 L2=2e12 V_L-V_H	8	PGK	GGGGSG	NS QVQ	2e12 V_H-V_L
2H7 V_L-V_H	Unión alterada hIgGl ccc->sss	hIgGl-CH2-CH3	H3 L3=2e12 V_L-V_H	10	PGK	NYGGGGSG	NS QVQ	2e12 V_H-V_L
2H7 V_L-V_H	Unión alterada hIgGl ccc->sss	hIgGl-CH2-CH3	H4 L4=2e12 V_L-V_H	13	PGK	GGGGSGGGGSG	NS QVQ	2e12 V_H-V_L
2H7 V_L-V_H	Unión alterada hIgGl ccc->sss	hIgGl-CH2-CH3	H5 L5=2e12 V_L-V_H	15	PGK	NYGGGGSGGGGSG	NS QVQ	2e12 V_H-V_L
2H7 V_L-V_H	Unión alterada hIgGl ccc->sss	hIgGl-CH2-CH3	H6 L6=2e12 V_L-V_H	18	PGK	GGGGSGGGGSGGGGSG	NS QVQ	2e12 V_H-V_L
2H7 V_L-V_H	Unión alterada hIgGl ccc->sss	hIgGl-CH2-CH3	H7	8	PGK	GCPPCP	NS QVQ	2e12 V_H-V_L

FIG. 6B (1 de 5)

Construcciones

Nombre	BD1	Bisagra	EFD	Ligador	BD2
2H7-sss-hIgG-STD1-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD1	2e12 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-STD1-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD1	2e12 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-STD2-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD2	2e12 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-STD2-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD2	2e12 (VH-VL)
2H7-csc-hIgG-STD1-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD1	2e12 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-STD2-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD2	2e12 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-STD1-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD1	2e12 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-STD2-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD2	2e12 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H1-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H1	2e12 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H1-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H1	2e12 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-H1-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H1	2e12 (VH-VL)
2H7-csc-hIgG-H1-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H1	2e12 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H2-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H2	2e12 (VH-VL)
2H7-csc-hIgG-H2-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H2	2e12 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-H2-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H2	2e12 (VH-VL)
2H7-csc-hIgG-H2-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H2	2e12 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H3-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H3	2e12 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H3-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H3	2e12 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-H3-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H3	2e12 (VH-VL)
2H7-csc-hIgG-H3-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H3	2e12 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H4-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H4	2e12 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H4-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H4	2e12 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-H4-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H4	2e12 (VH-VL)
2H7-csc-hIgG-H4-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H4	2e12 (VH-VL)

FIG. 6B (2 de 5)

Nombre	BD1	Bisagra	EFD	Ligador	BD2
2H7-sss-hIgG-H5-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H5	2e12 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H5-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H5	2e12 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-H5-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H5	2e12 (VH-VL)
2H7-csc-hIgG-H5-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H5	2e12 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H6-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H6	2e12 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H6-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H6	2e12 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-H6-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H6	2e12 (VH-VL)
2H7-csc-hIgG-H6-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H6	2e12 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H7-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H7	2e12 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H7-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H7	2e12 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-H7-2e12 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H7	2e12 (VH-VL)
2H7-csc-hIgG-H7-2e12 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H7	2e12 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-STD1-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD1	G28-1 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-STD1-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD1	G28-1 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-STD2-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD2	G28-1 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-STD2-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD2	G28-1 (VH-VL)
2H7-csc-hIgG-STD1-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD1	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-STD2-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD2	G28-1 (VH-VL)
2H7-csc-hIgG-STD1-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD1	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-STD2-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD2	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H1-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H1	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H1-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H1	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H1-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H1	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H1-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H1	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H2-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H2	G28-1 (VL-VH)

FIG. 6B (3 of 5)

Name	BD1	Hinge	EFD	Linker	BD2
2H7-csc-hIgG-H2-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H2	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H2-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H2	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H2-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H2	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H3-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H3	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H3-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H3	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H3-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H3	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H3-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H3	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H4-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H4	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H4-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H4	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H4-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H4	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H4-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H4	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H5-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H5	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H5-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H5	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H5-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H5	G28-1 (VH-VL)
2H7-csc-hIgG-H5-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H5	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H6-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H6	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H6-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H6	G28-1 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-H6-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H6	G28-1 (VH-VL)
2H7-csc-hIgG-H6-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H6	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H7-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H7	G28-1 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H7-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H7	G28-1 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-H7-G28-1 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H7	G28-1 (VH-VL)
2H7-csc-hIgG-H7-G28-1 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H7	G28-1 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-STD1-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD1	G19-4 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-STD1-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD1	G19-4 (VH-VL)

FIG. 6B (4 of 5)

Name	BD1	Hinge	EFD	Linker	BD2
2H7-sss-hIgG-STD2-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD2	G19-4 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-STD2-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD2	G19-4 (VH-VL)
2H7-csc-hIgG-STD1-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD1	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-STD2-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD2	G19-4 (VH-VL)
2H7-csc-hIgG-STD1-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD1	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-STD2-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	STD2	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H1-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H1	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H1-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H1	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H1-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H1	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H1-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H1	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H2-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H2	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H2-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H2	G19-4 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-H2-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H2	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H2-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H2	G19-4 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-H3-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H3	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H3-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H3	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H3-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H3	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H3-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H3	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H4-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H4	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H4-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H4	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H4-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H4	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H4-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H4	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H5-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H5	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H5-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H5	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H5-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H5	G19-4 (VL-VH)

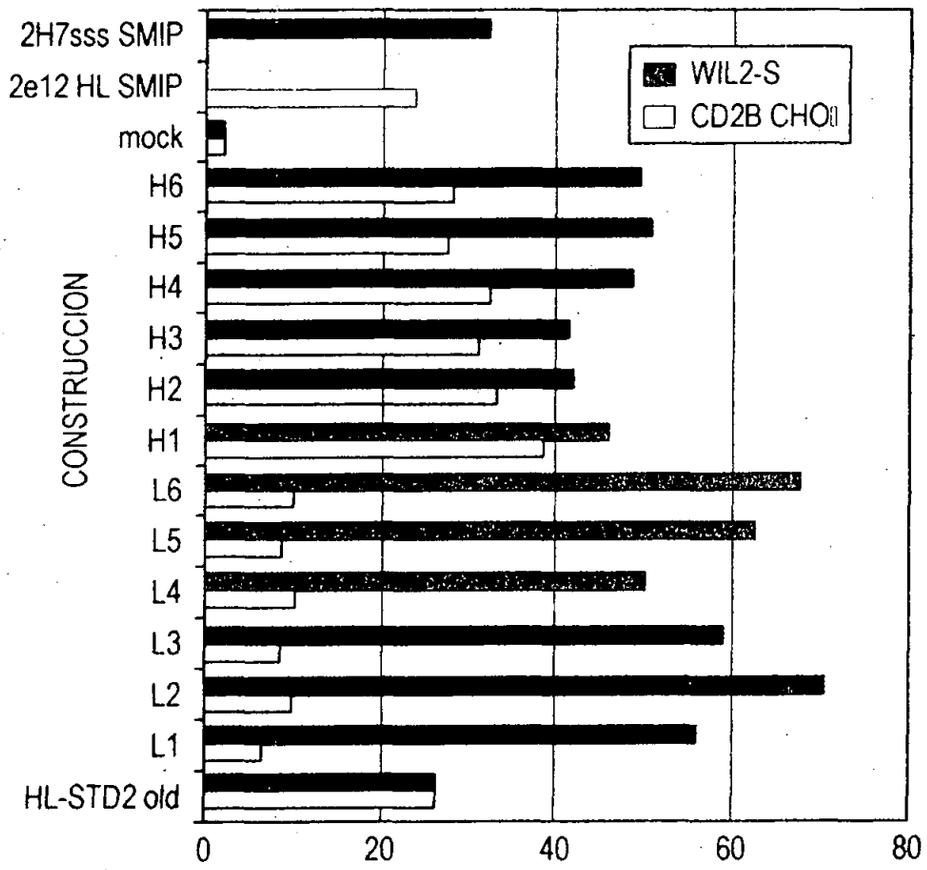
FIG. 6B (5 de 5)

Nombre	BD1	Bisagra	EFD	Ligador	BD2
2H7-csc-hIgG-H5-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H5	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H6-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H6	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H6-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H6	G19-4 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-H6-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H6	G19-4 (VH-VL)
2H7-csc-hIgG-H6-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H6	G19-4 (VH-VL)
2H7-sss-hIgG-H7-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H7	G19-4 (VL-VH)
2H7-csc-hIgG-H7-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H7	G19-4 (VL-VH)
2H7-sss-hIgG-H7-G19-4 HL	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -SSS	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H7	G19-4 (VH-VL)
2H7-csc-hIgG-H7-G19-4 LH	2H7 (VL-VH)	hIgG1 -csc	hIgG or hIgG (P238S/P331S)	H7	G19-4 (VH-VL)

FIG. 7

ALTERANDO EL LIGADOR DESPUES DEL EFD Y DE LA ORIENTACION DE LAS REGIONES V EN ELANCES BD2 QUE AFECTAN LA EFCIENCIA DE FUSION DE PROTEINA MULTIESPECIFA

ENLACE DE FUSION DE PROTEINA MULTIESPECIFICA 2H7-SSShIgG-L/Hx-2e12 CON VARIOS LIGADORES A WIL2-S AND CD28 CHO



**TODAS LAS FUSIONES DE PROTEINAS USADAS A 0.72 ug/mL, UNA PROTEINA PURIFICADA, GENERADA DESDE SOBRENADANTES COS TRANSITORIOS.

317

FIG. 8

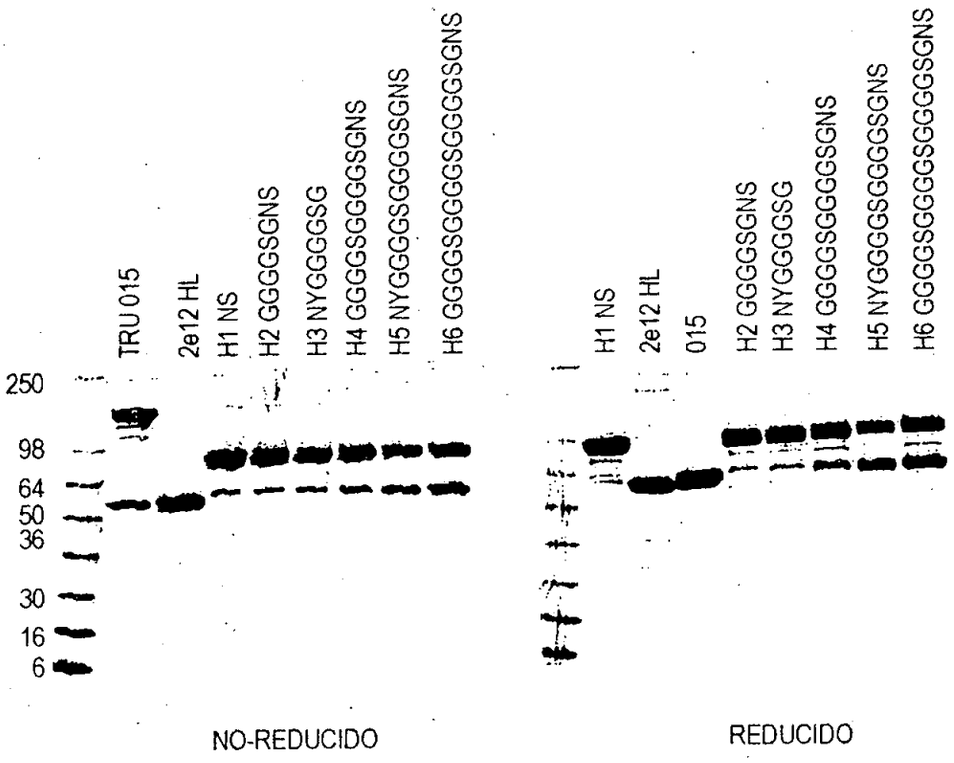

250
98
64
50
36
30
16
6
TRU 015
2e12 HL
H1 NS
H2 GGGGSGNS
H3 NYGGGGSG
H4 GGGGSGGGGSGNS
H5 NYGGGGSGGGGSGNS
H6 GGGGSGGGGSGGGGSGNS
NO-REDUCIDO
H1 NS
2e12 HL
015
H2 GGGGSGNS
H3 NYGGGGSG
H4 GGGGSGGGGSGNS
H5 NYGGGGSGGGGSGNS
H6 GGGGSGGGGSGGGGSGNS
REDUCIDO

FIG. 9

Transferencia Western de Proteínas de Fusión Específica con Ligador H6
A. Ausencia de SMIP o formas más pequeñas detectables CD28
B. Presencia de un tamaño SMIP al utilizar Fab anti-id CD10

A. Detección de 2e12BD2
por CD28-murinelgG

B. Detección de 2H7 CD20
BD1 Fab: AbyD02429.2

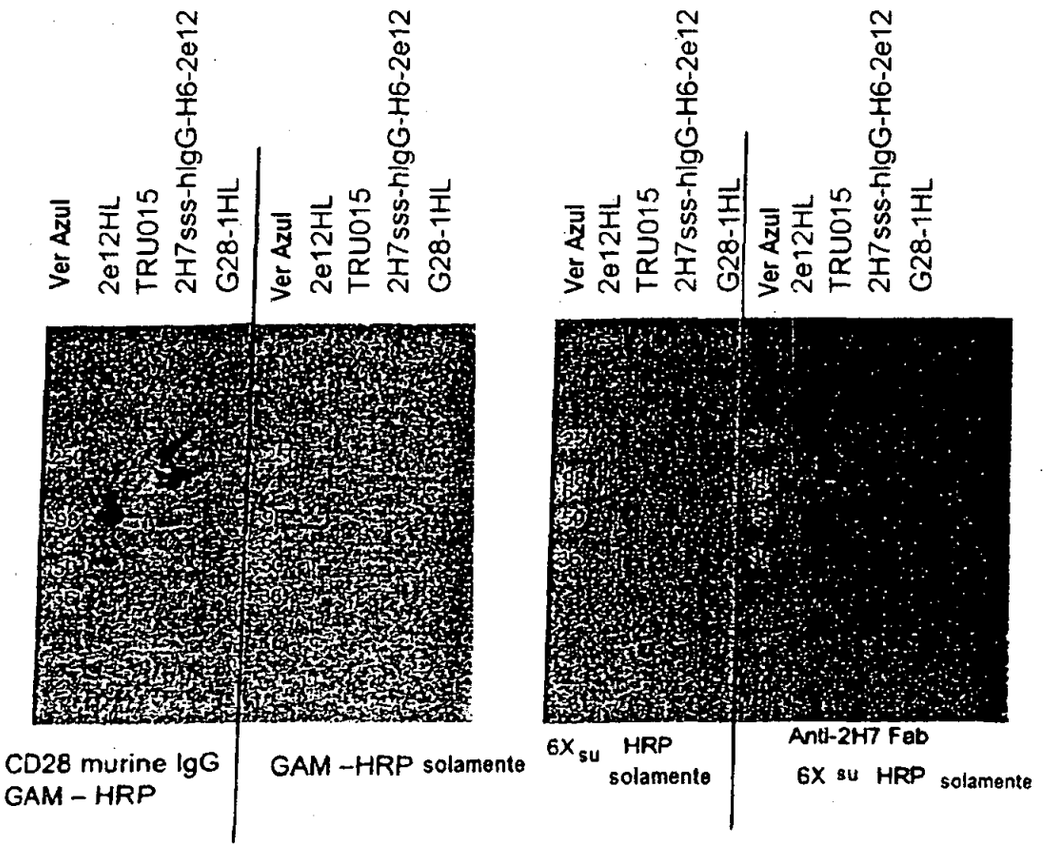
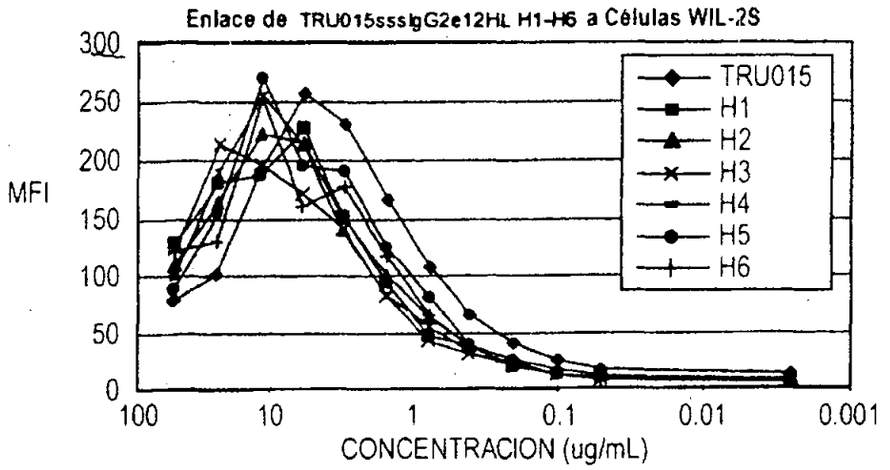
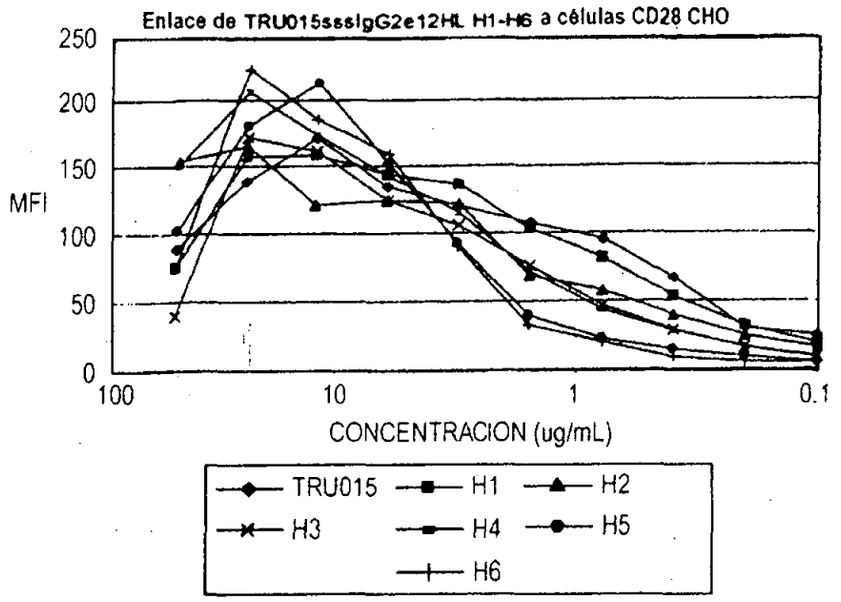


FIG. 10

A. Enlace de Proteinas de Fusión Multiespecifica con Ligadores Variantes a células WIL-S



B. Enlace de Proteinas de Fusión Multiespecifica con Ligadores Variantes a Células CD28 CHO



320

FIG. 11

Resumen de Fraccionamiento SEC de las Proteínas de Fusión Multiespecíficas 2H7-sssIgG-2e 12 con Variantes de Ligadores

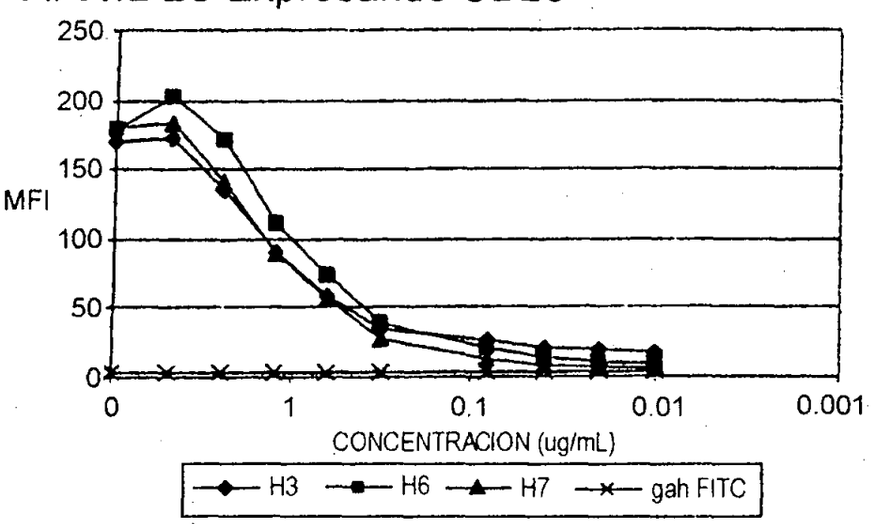
ID de Ligador	Tiempo de Retención del POI	% POI	% en Otras Formas	Página - SDS Análisis de Clivado en la unión EFD/BD2
H1	7.620	70.9	29.0	(Si)
H2	7.589	67.5	32.5	(Si)
H3	7.605	68.7	31.4	Si
H4	7.622 (hombro)	68.0	32.0	Si
H5	7.933/7.680 (doblete con hombro)	32.42/33.94	33.63	Si
H6	7.901/7.69 (doblete con hombro)	34.5/29.3	36.1	Si
H7	7.788	84.2	15.8 (HMW)	NO

321

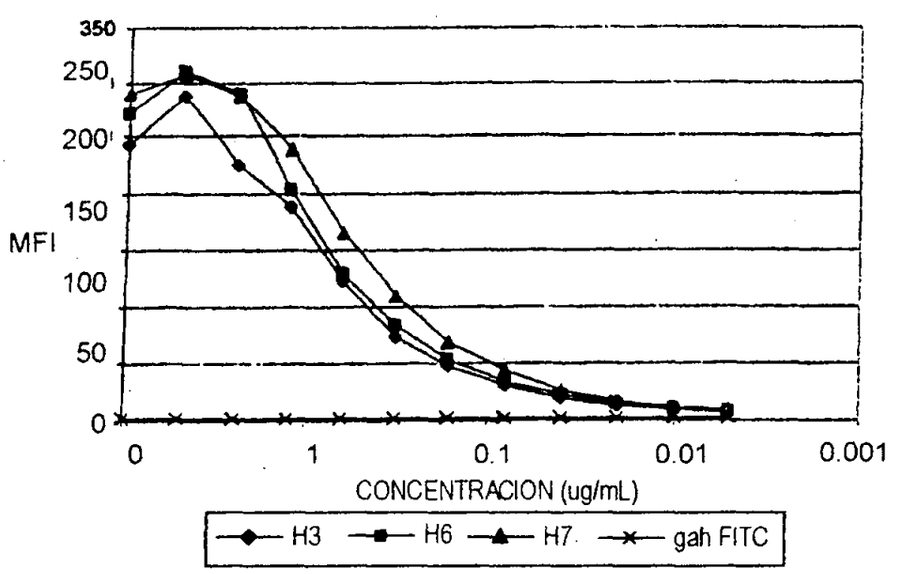
FIG. 12

Enlace de Fusión de Proteínas[2H7-sss-hIgG-H_X-2e12 HL] con Diferentes Ligadores a Células que Expresan Antígenos Objetivos para BD1 o BD2

A. WIL-2S Expresando CD20



B. Células CD28 CHO



322

FIG. 13

Enlaces Simultáneos de BD1 y BD2:

Enlace de Fusión de Proteínas [2H7-ssshIgG-H $_1$-2e12 HL] con ligadores H3, H6 y H7 a Células WIL -2S pueden ser detectados con CD28mIgG + FITC anti-ratón

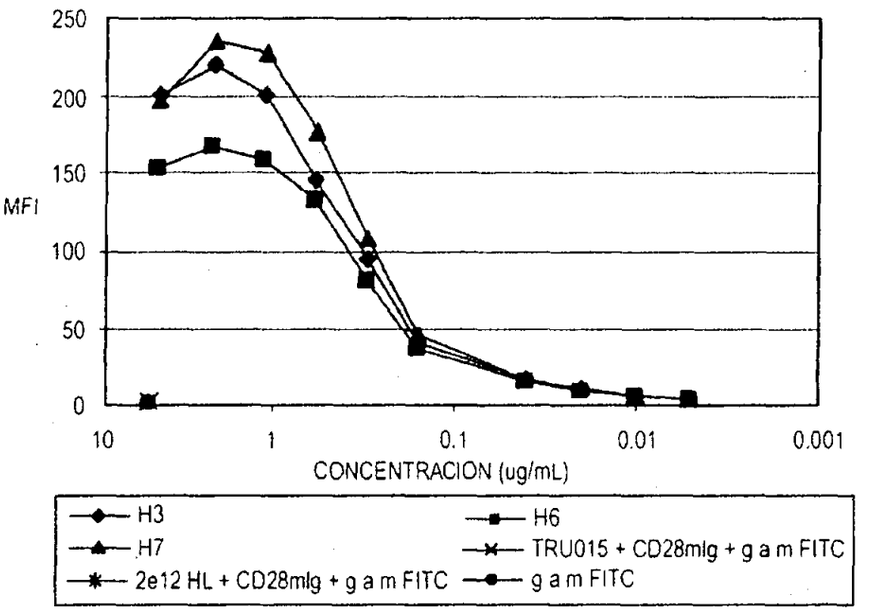
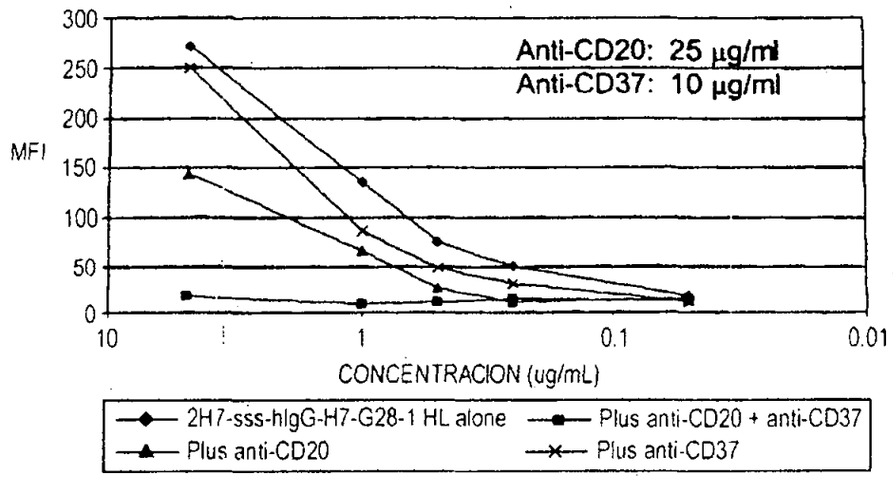


FIG. 14

A. **Bloqueo de la Proteína de Enlace 2H7-sss-hIgG-H7-G28-1 HL a las Células Ramos por los Anticuerpos Específicos CD20 y/o CD37**



B. **Bloqueo de 2H7-sss-hIgG-H7-G28-1 HL a Células BJAB por Anticuerpos Específicos CD20 y/o CD37**

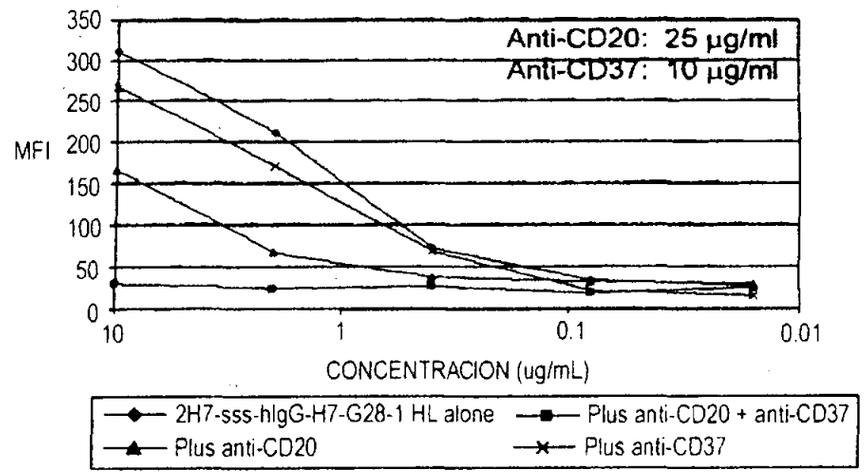


FIG. 15

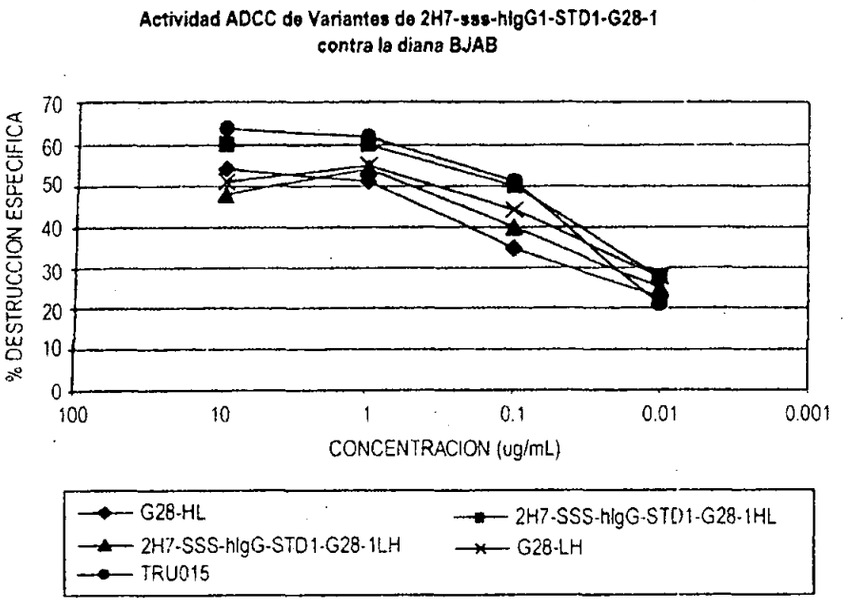

Actividad ADCC de Variantes de 2H7-sss-hIgG1-STD1-G28-1
contra la diana BJAB
% DESTRUCCION ESPECIFICA
70
60
50
40
30
20
10
0
100
10
1
0.1
0.01
0.001
CONCENTRACION (ug/mL)
G28-HL
2H7-SSS-hIgG-STD1-G28-1HL
2H7-SSS-hIgG-STD1-G28-1LH
G28-LH
TRU015

FIG. 16

El Porcentaje de Linfocitos Positivos CD3, CD19 y CD40 presentes en cultivos después de incubación con TRU-015, G28-1 SMIP, TRU-015+G28-1 SMIP, or 2H7-sss-hIgG1-H7-G28-1 HL

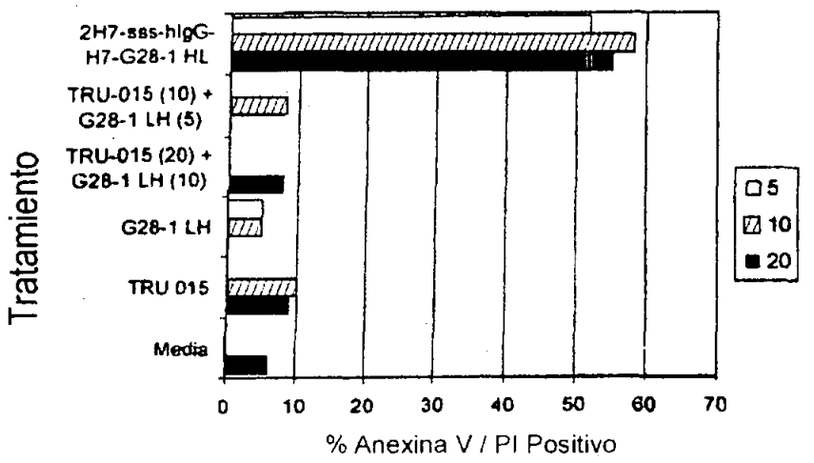
24 Horas	CD3+	CD19+	CD40+
Media	77%	8%	7%
TRU015	76%	8.5%	7.9%
G28-1 SMIP	78%	8. 9%	7.8%
TRU015+G28-1 SMIP	76.3%	8.1%	7.5%
2H7-ssshIgG1-G28-1HL (H7)	78.4%	8.9%	7.9%

72 Horas	CD3+	CD19+	CD40+
Media	78.5%	7.9%	7.7%
TRU015	85.2%	2.3%	2.7%
G28-1 SMIP	86.7%	2.2%	2.3%
TRU015+G28-1 SMIP	87.1%	1.1%	1.1%
2H7-ssshIgG1-G28-1 HL (H7)	96.7%	.08%	.77%

FIG. 17

El Porcentaje de Anexina y/o PI Positivo de Células B en Cultivos después de 24 Horas de Incubación con Proteínas de Fusión Sola o Multiespecífica

A. Células Ramos:



B. Células Daudi:

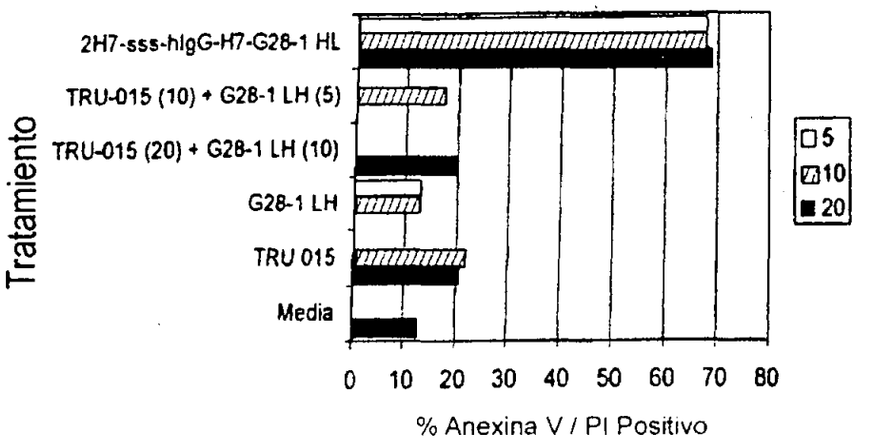
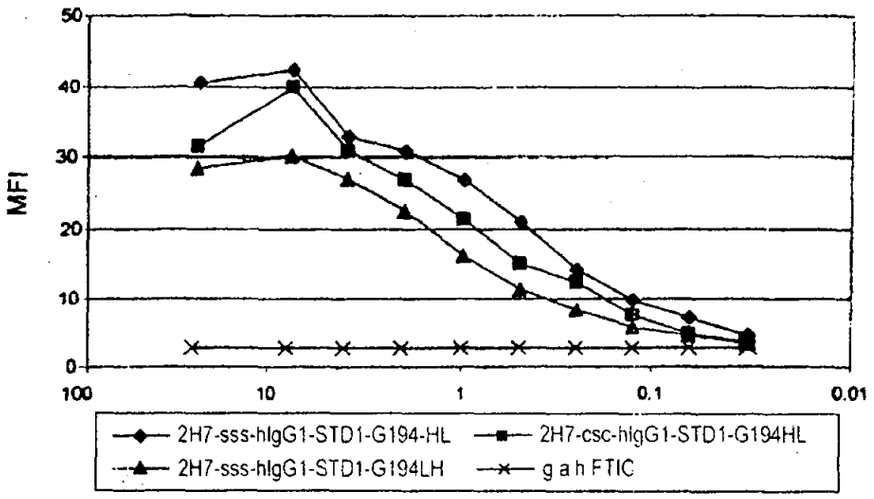


FIG. 18

A Enlace de Fusión de Proteínas 2H7-hIgG-G 19-4 a Células Jurkat



B. Enlace de 2H7-hIgG-G19-4 a Células WIL2S

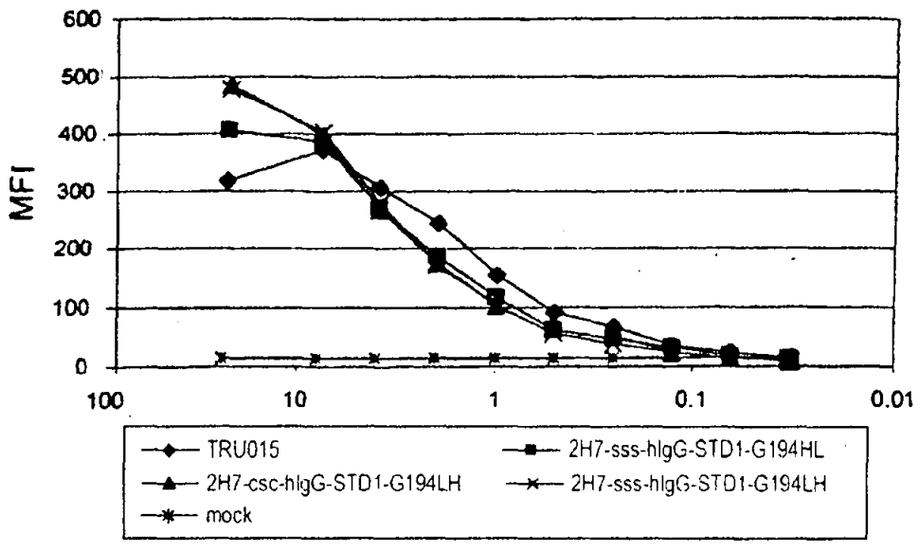
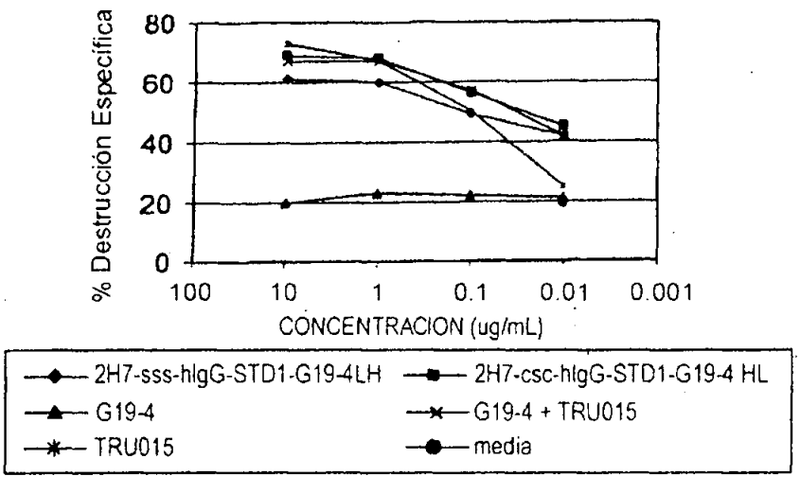


FIG. 19

A. **Actividad ADCC de Proteínas de Fusión Multiespecífica 2H7-G 19-4 Contra Dianas BJAB Usando Efectores Humanos PBMC a 25:1**



B. Actividad ADCC en Células NK Aisladas de PBMC como Células Efectoras Usando Dianas BJAB (30:1, E:T) y Fusión de Proteínas 2H7-G19-4

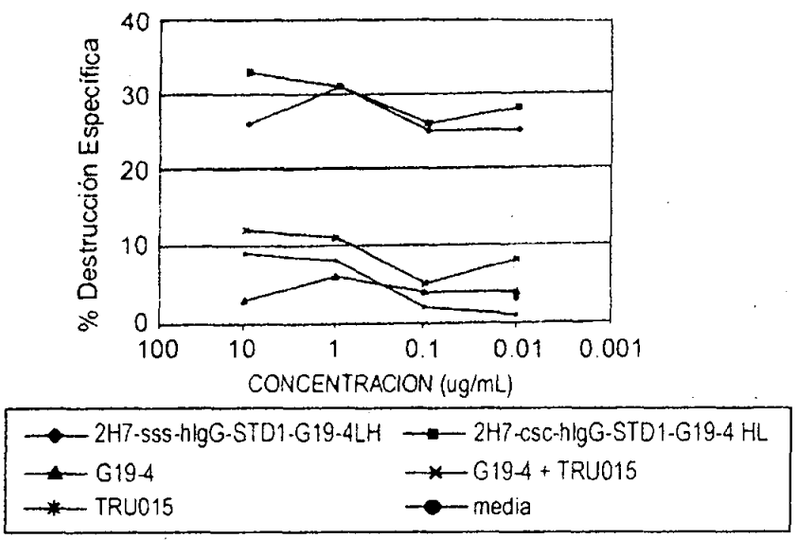
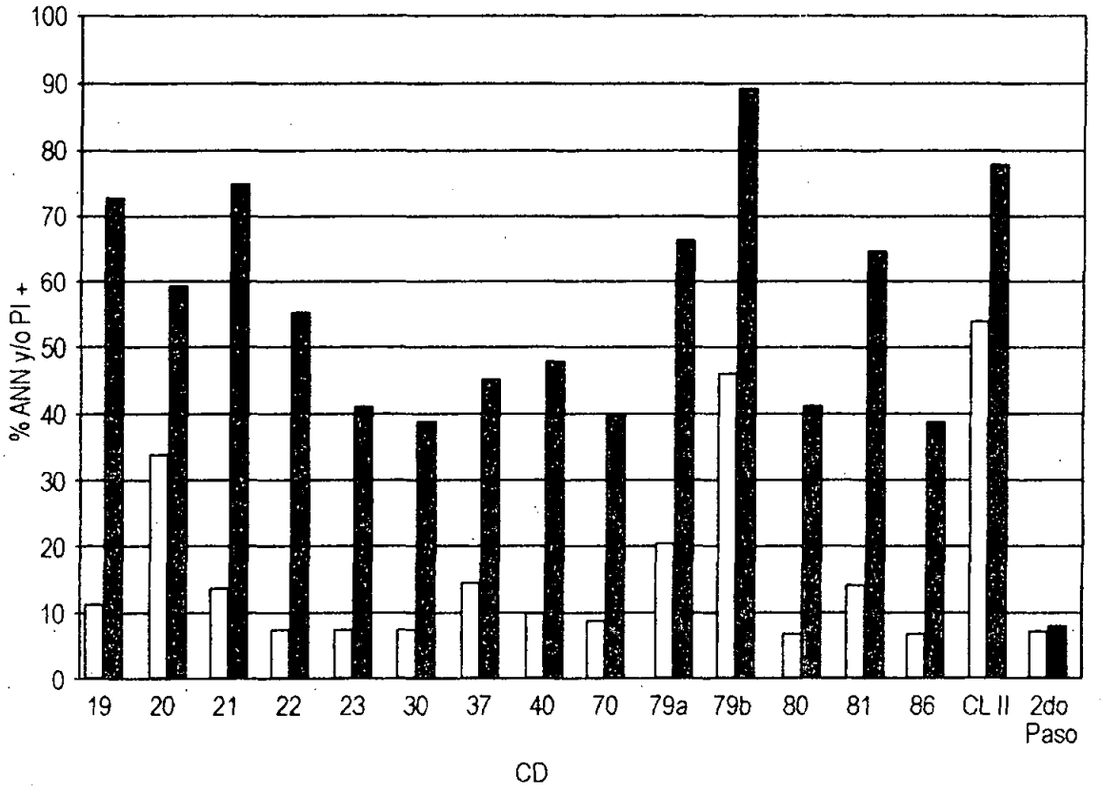


FIG. 20


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% ANN y/o PI +
19
20
21
22
23
30
37
40
70
79a
79b
80
81
86
CL II
2do Paso
CD

330

FIG. 21

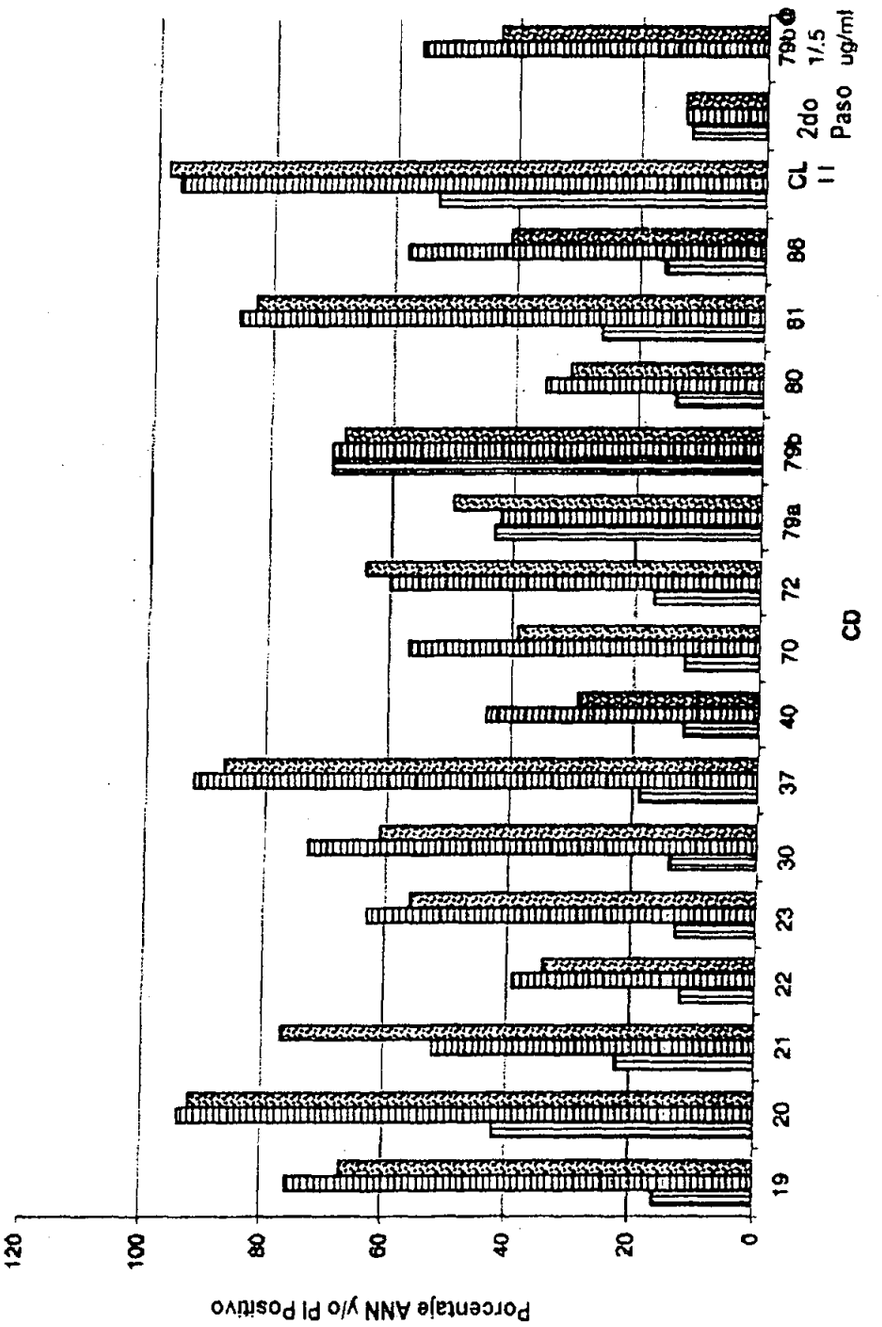

Porcentaje ANN y/o PI Positivo
120
100
80
60
40
20
0
19
20
21
22
23
30
37
40
70
72
79a
79b
80
81
86
CL
2do
1/5
ug/ml
Paso
CD

FIG. 22

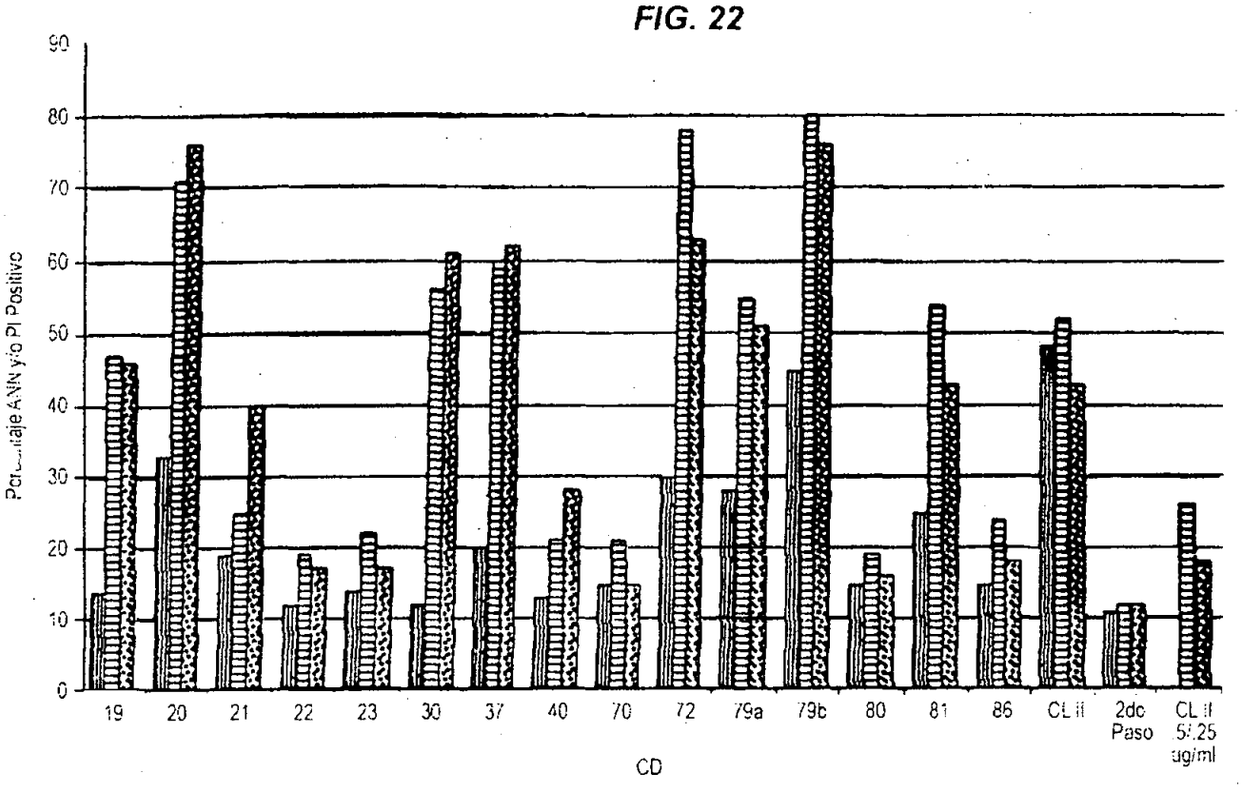

90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Porcentaje ANN y/o PI Positivo
19
20
21
22
23
30
37
40
70
72
79a
79b
80
81
86
CL II
2do Paso
CL II 5µg/ml
CD

FIG. 23

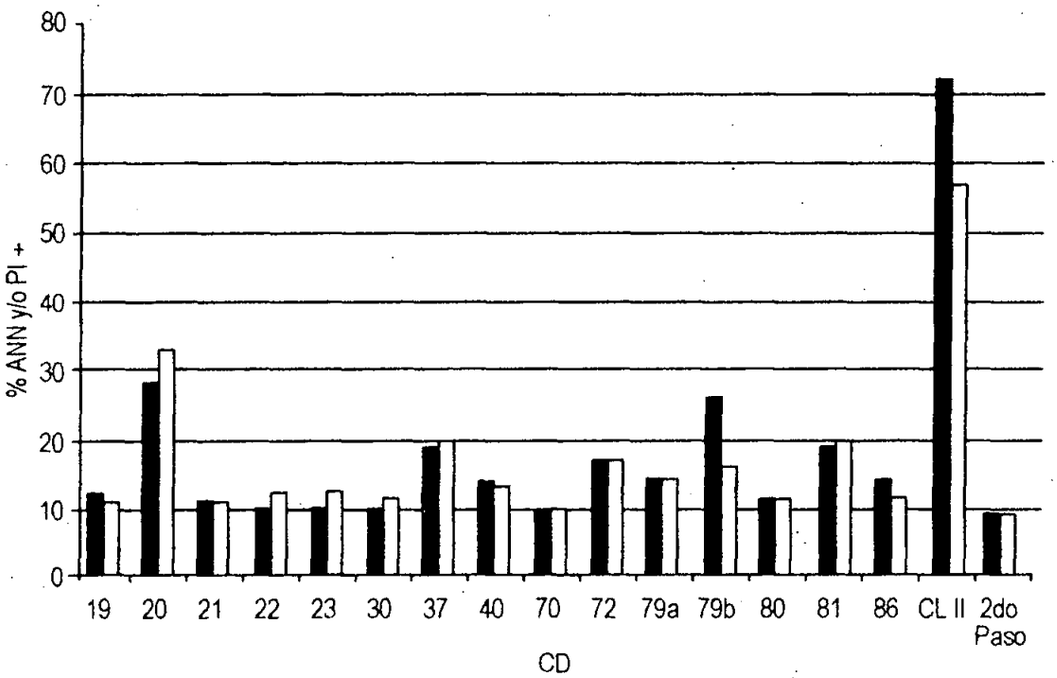

80
70
60
50
40
30
20
10
0
% ANN y/o PI +
19
20
21
22
23
30
37
40
70
72
79a
79b
80
81
86
CL II
2do Paso
CD

FIG. 24

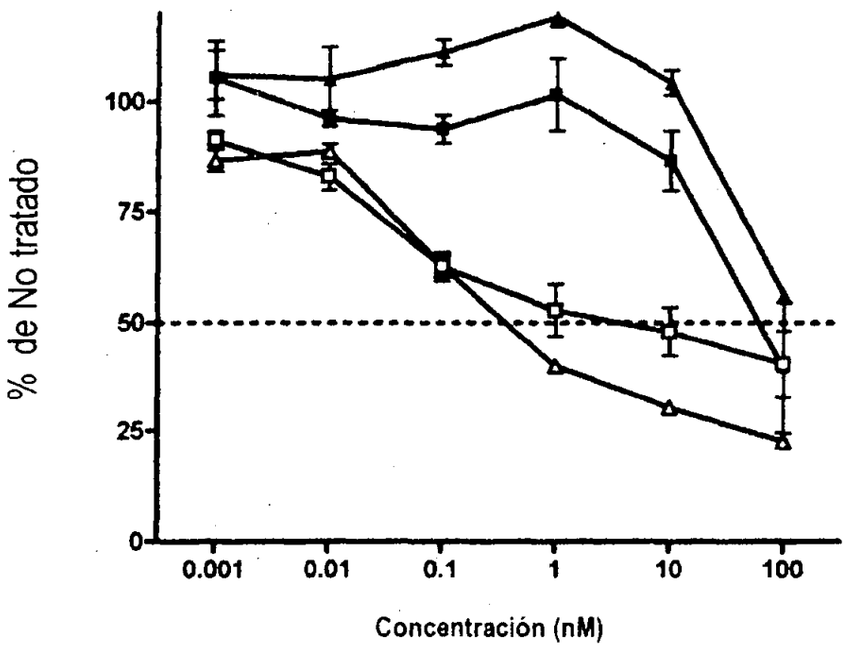

% de No tratado
100
75
50
25
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentración (nM)

FIG. 25

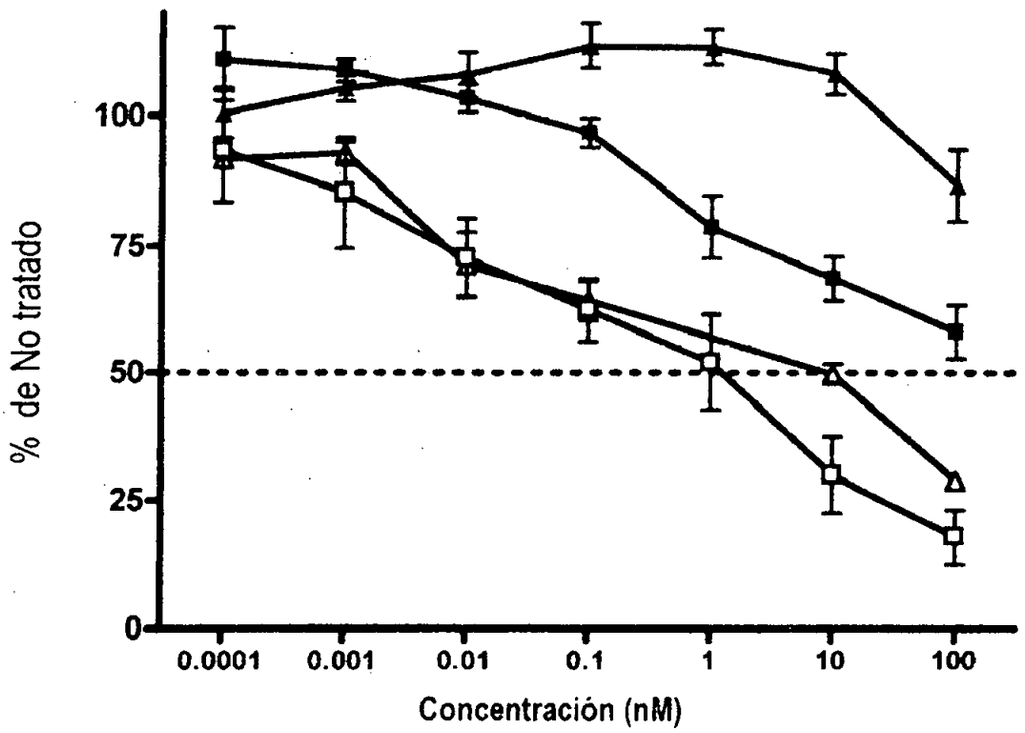

% de No tratado
100
75
50
25
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentración (nM)

FIG. 26

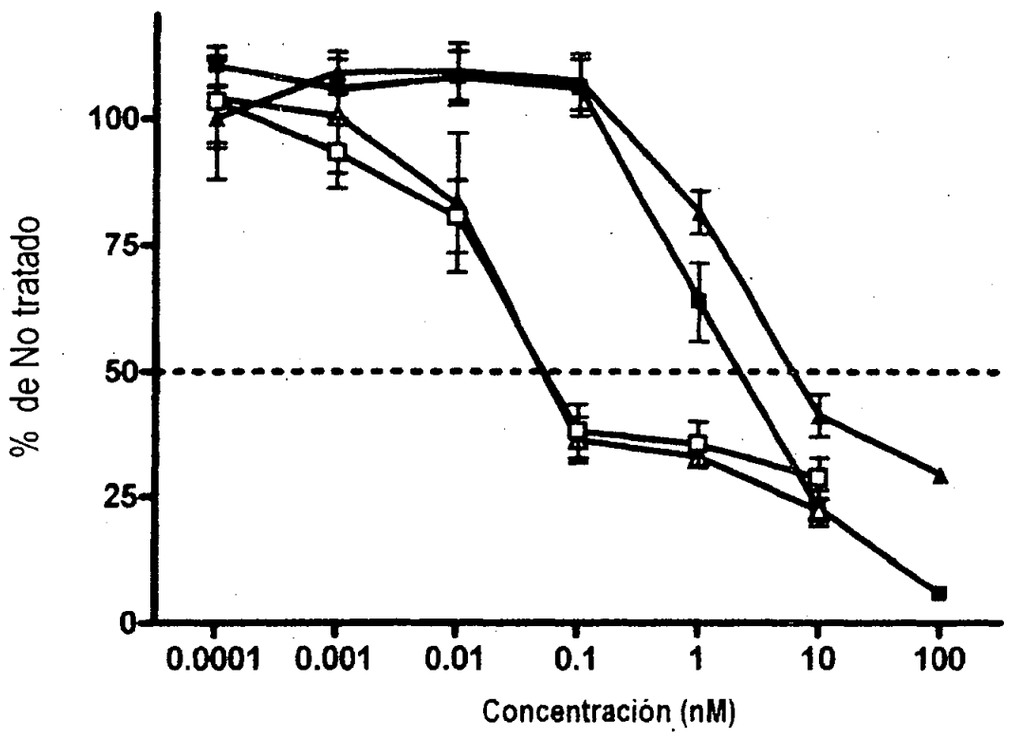
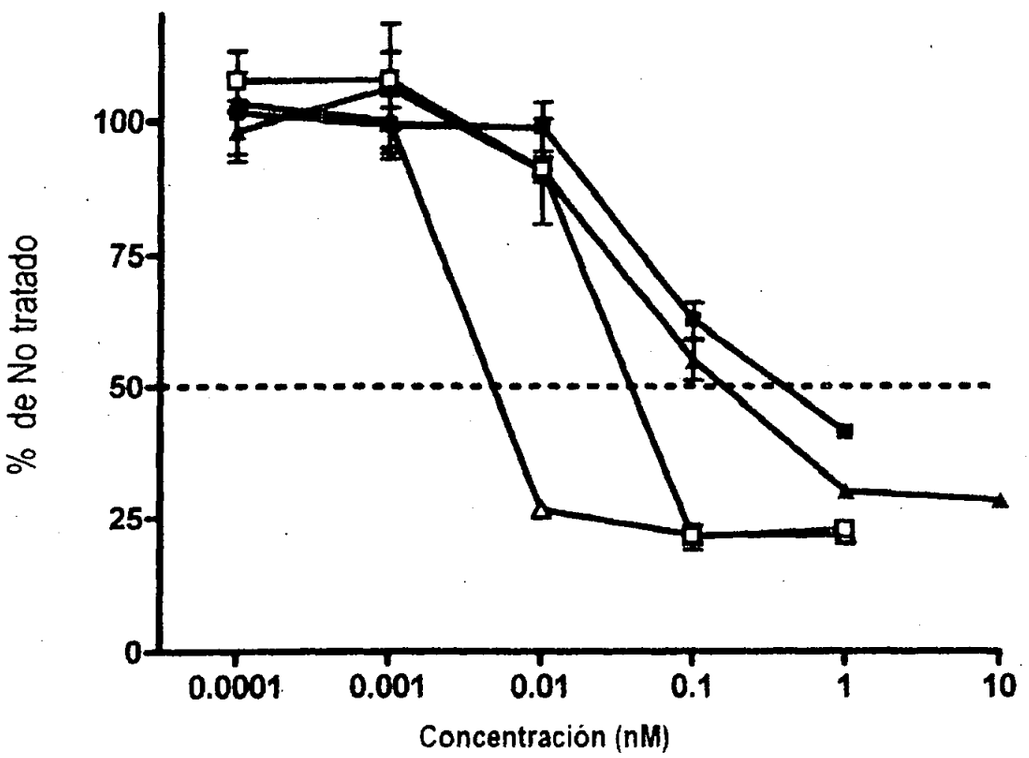

% de No tratado
100
75
50
25
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentración (nM)

FIG. 27


% de No tratado
100
75
50
25
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
Concentración (nM)

337

FIG. 28

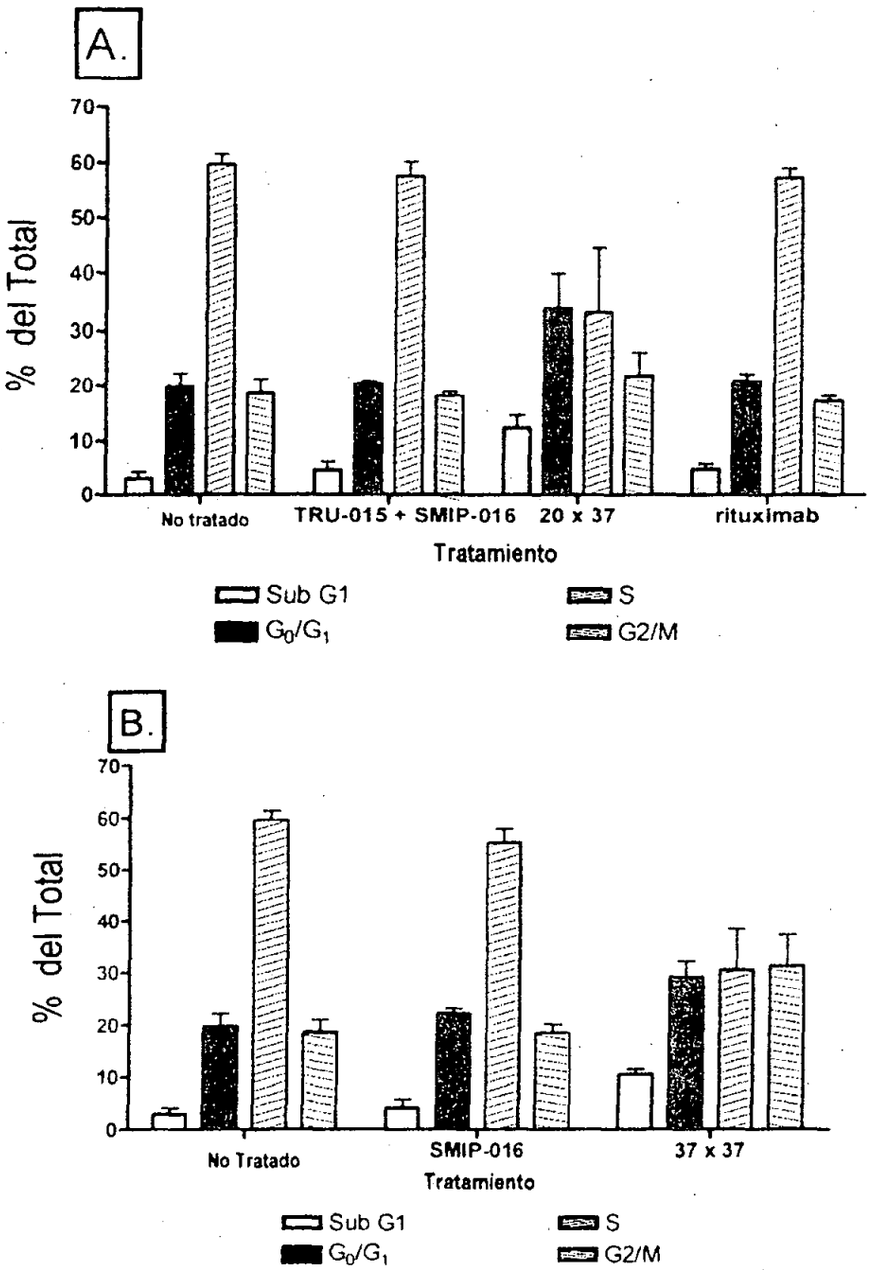

A.
% del Total
70
60
50
40
30
20
10
0
No tratado
TRU-015 + SMIP-016 20 x 37
rituximab
Tratamiento
Sub G1
S
G_0/G_1
G2/M
B.
% del Total
70
60
50
40
30
20
10
0
No Tratado
SMIP-016
37 x 37
Tratamiento
Sub G1
S
G_0/G_1
G2/M

FIG. 29

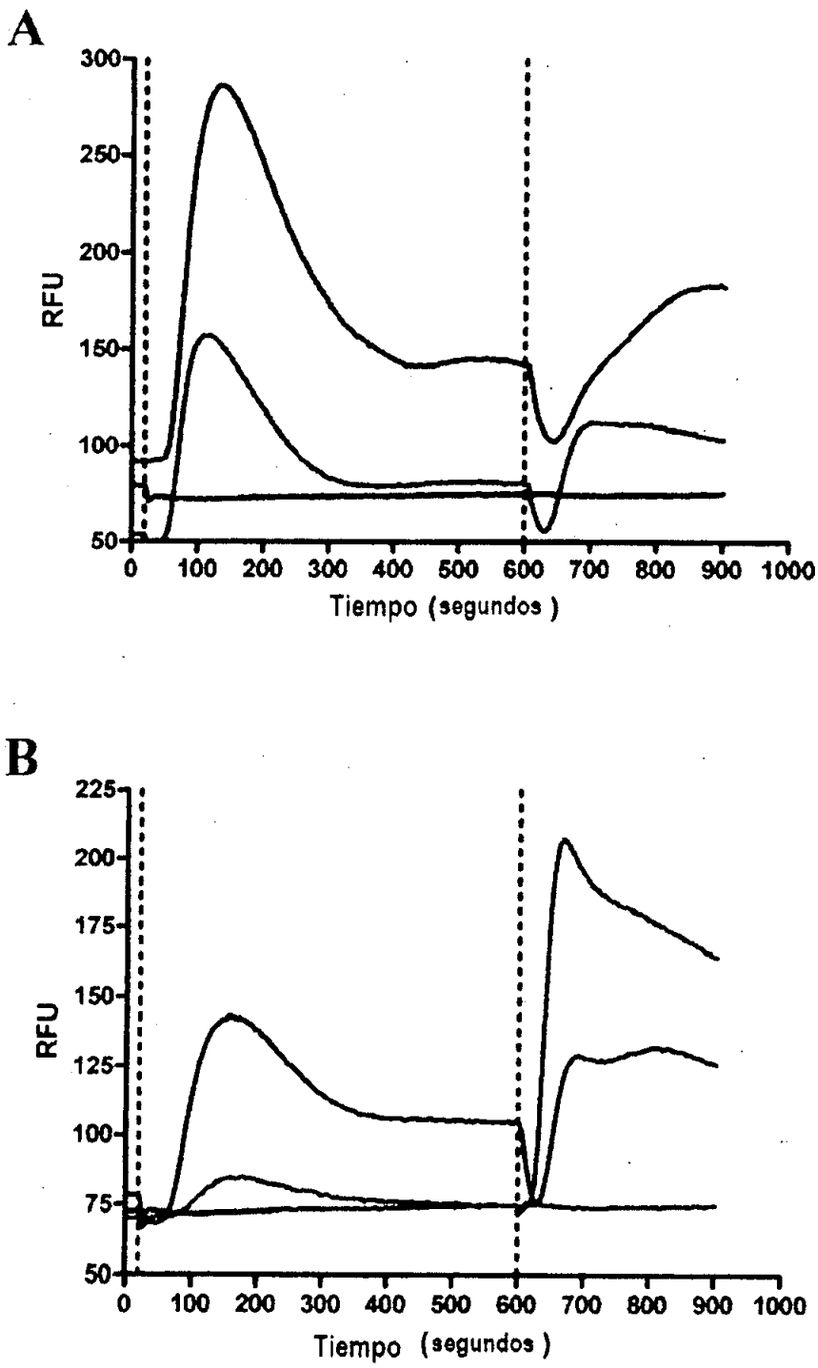
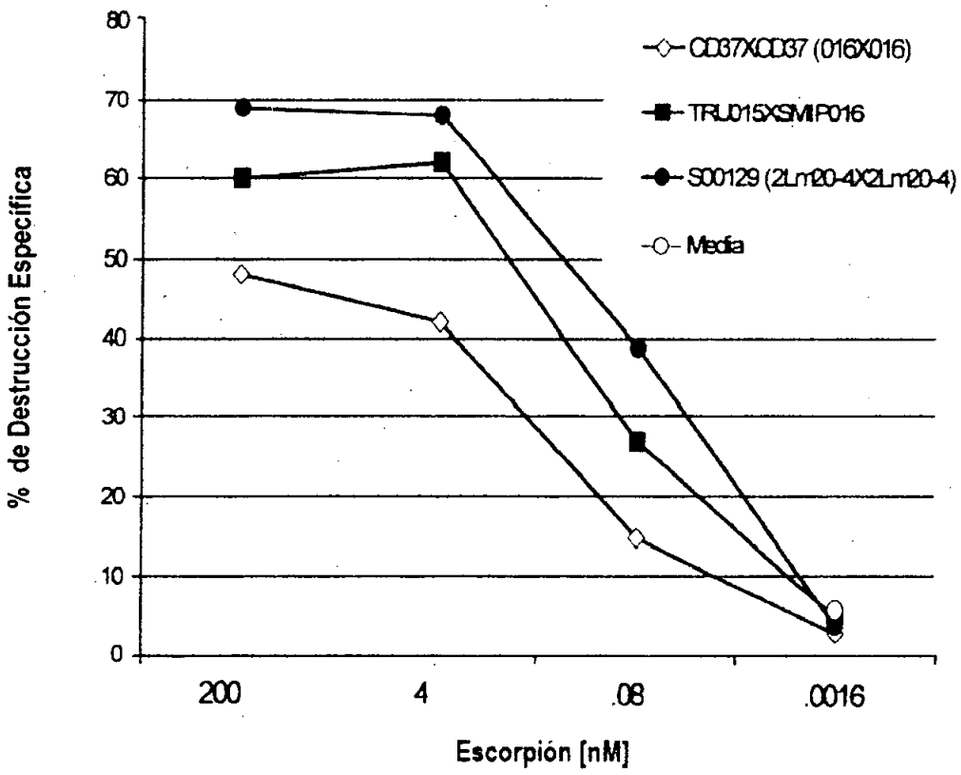

A
300
250
200
150
100
50
RFU
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
Tiempo (segundos)
B
225
200
175
150
125
100
75
50
RFU
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
Tiempo (segundos)

FIG. 30


80
70
60
50
40
30
20
10
0
% de Destrucción Específica
200
4
.08
.0016
Escorpión [nM]
CD37XCD37 (016X016)
TRU015XSMIP016
S00129 (2Lm20-4X2Lm20-4)
Media

340

FIG. 31

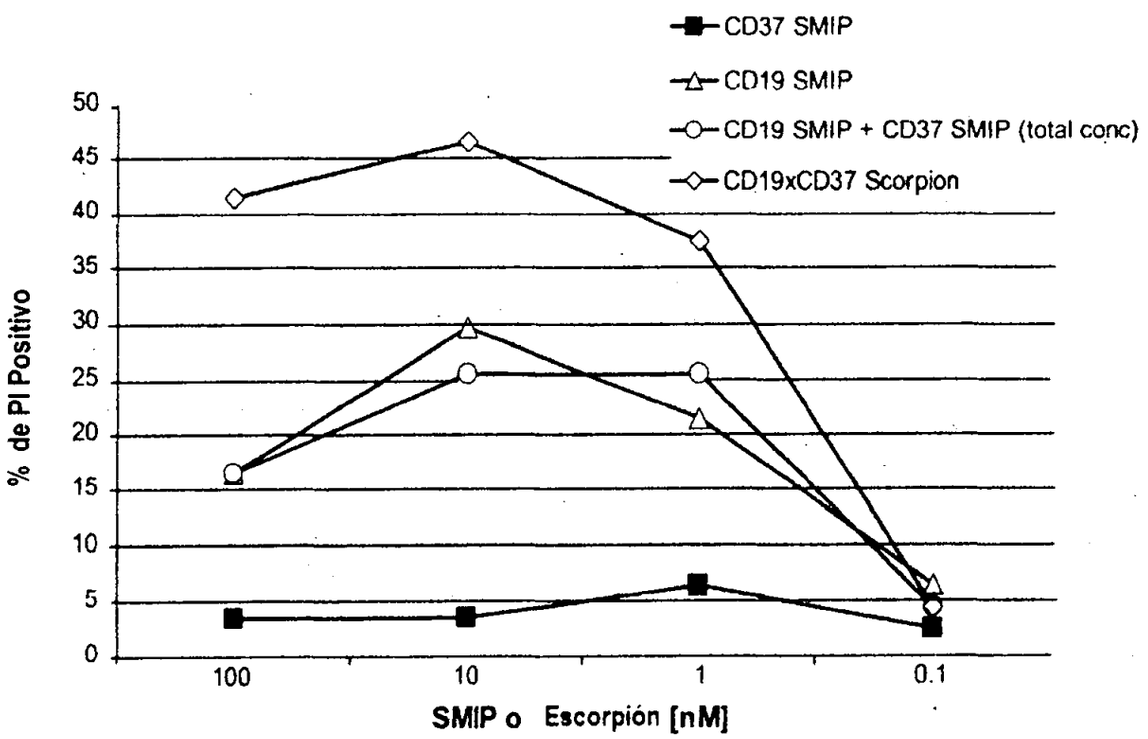

CD37 SMIP
CD19 SMIP
CD19 SMIP + CD37 SMIP (total conc)
CD19xCD37 Scorpion
% de PI Positivo
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
100
10
1
0.1
SMIP o Escorpión [nM]

FIG. 32A

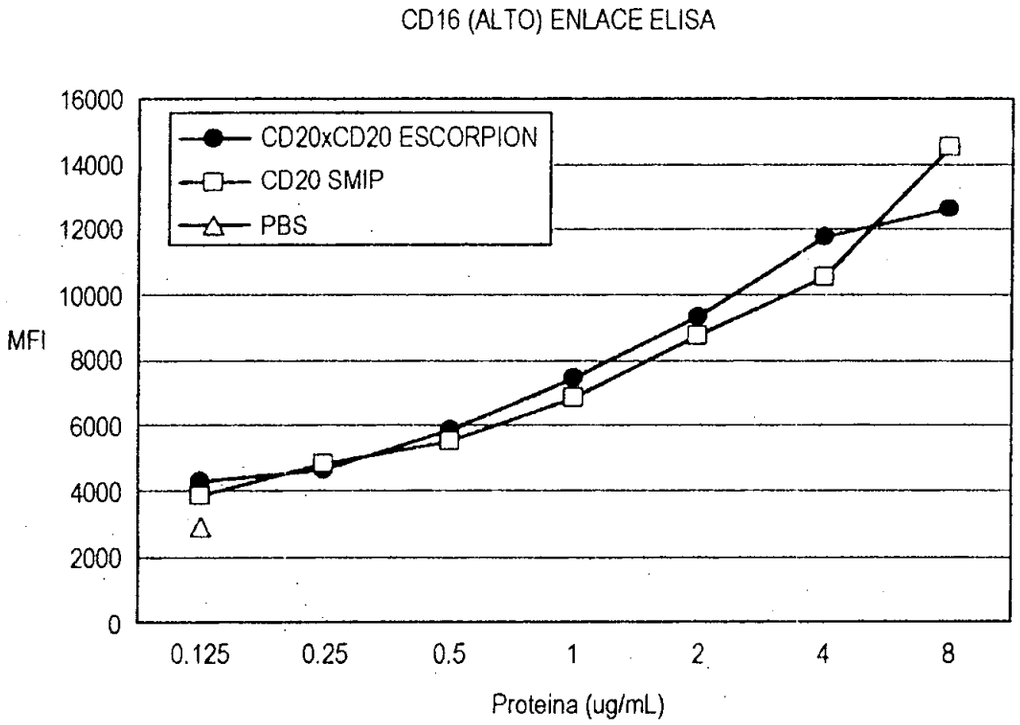

CD16 (ALTO) ENLACE ELISA
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
MFI
CD20xCD20 ESCORPION
CD20 SMIP
PBS
0.125
0.25
0.5
1
2
4
8
Proteina (ug/mL)

FIG. 32B

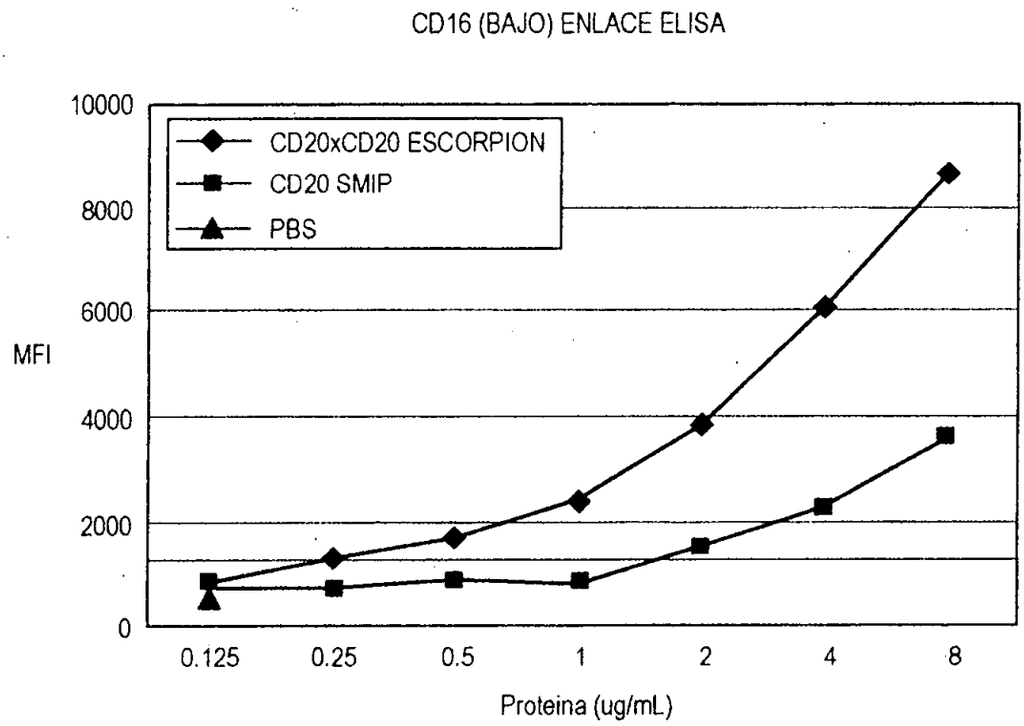

CD16 (BAJO) ENLACE ELISA
CD20xCD20 ESCORPION
CD20 SMIP
PBS
MFI
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.125
0.25
0.5
1
2
4
8
Proteina (ug/mL)

FIG. 33

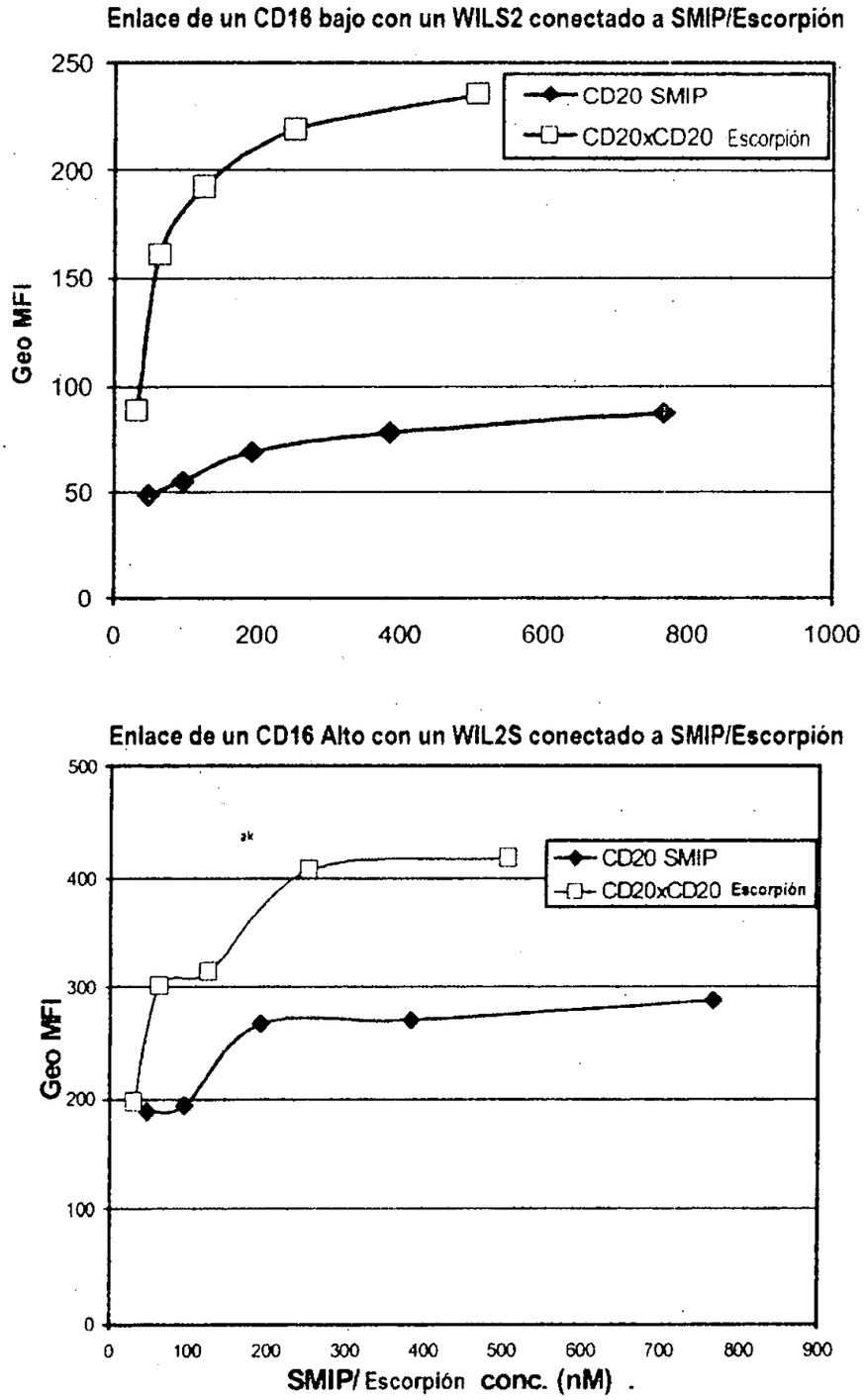

Enlace de un CD16 bajo con un WILS2 conectado a SMIP/Escorpión
Geo MFI
250
200
150
100
50
0
0
200
400
600
800
1000
CD20 SMIP
CD20xCD20 Escorpión
Enlace de un CD16 Alto con un WIL2S conectado a SMIP/Escorpión
Geo MFI
500
400
300
200
100
0
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
CD20 SMIP
CD20xCD20 Escorpión
SMIP/ Escorpión conc. (nM)

FIG. 34

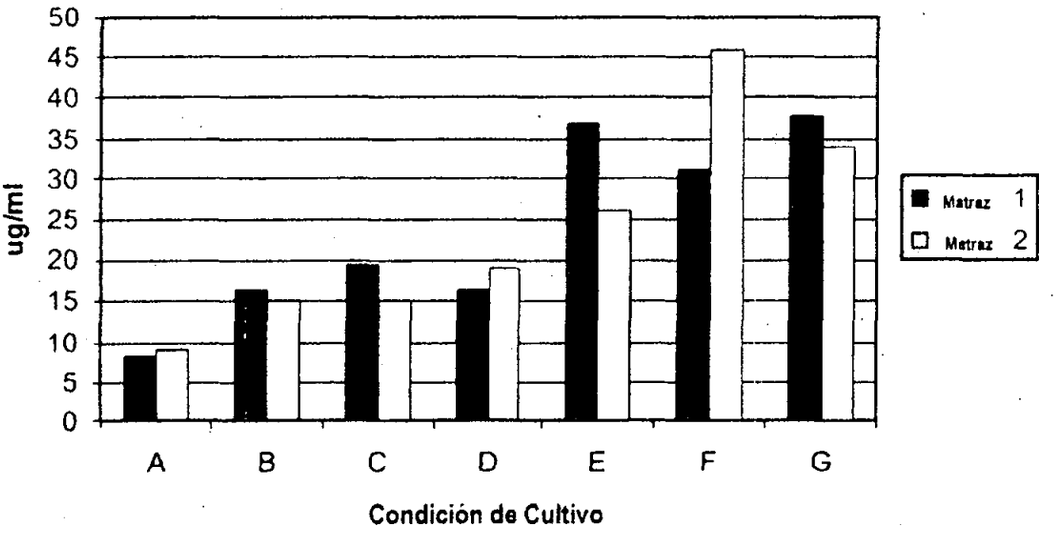
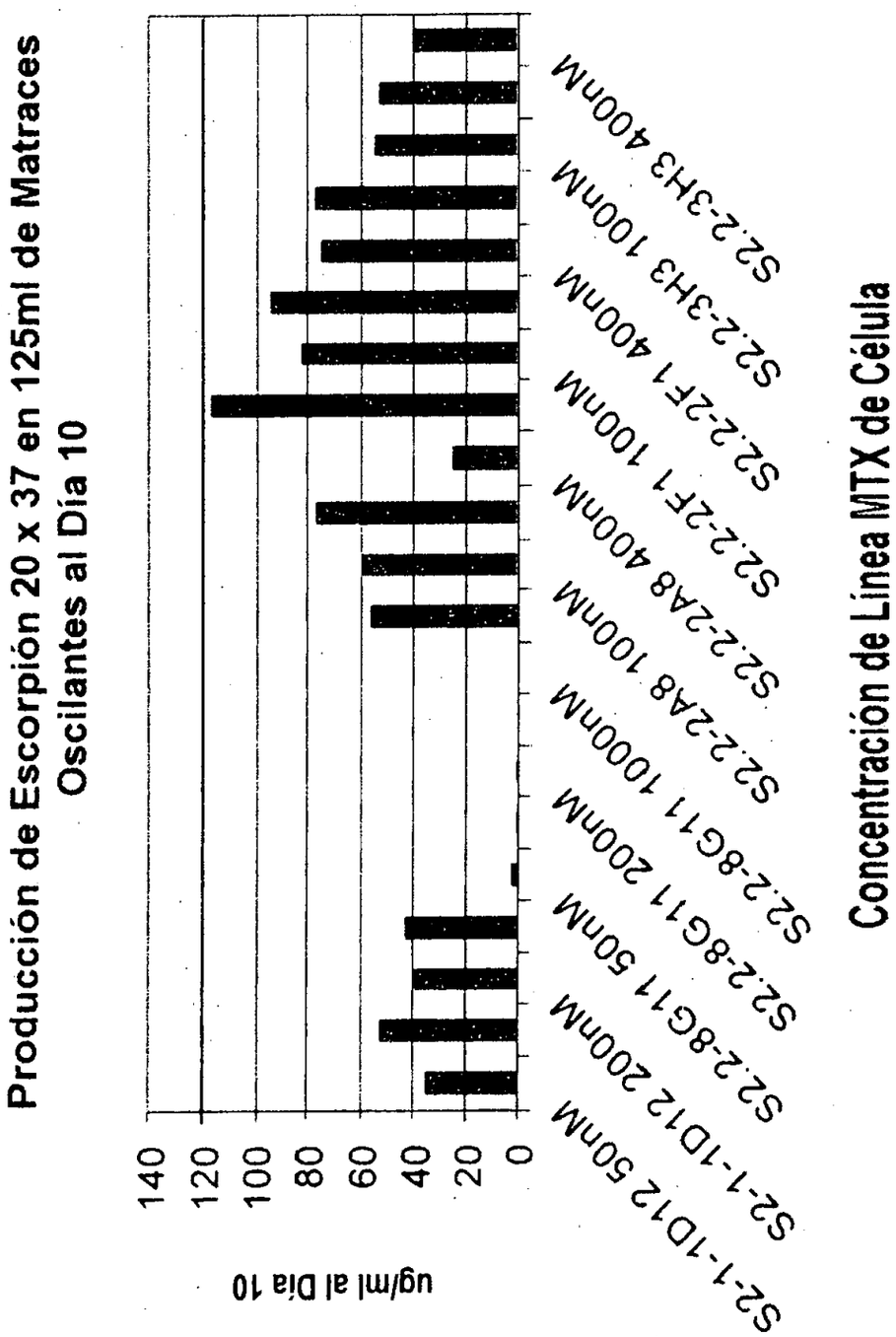

50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
ug/ml
A
B
C
D
E
F
G
Condición de Cultivo
Matraz 1
Matraz 2

FIG. 35


Producción de Escorpión 20 x 37 en 125ml de Matraces Oscilantes al Día 10
ug/ml al Día 10
0
20
40
60
80
100
120
140
S2-1-1D12 50nM
S2-1-1D12 200nM
S2.2-8G11 50nM
S2.2-8G11 200nM
S2.2-8G11 1000nM
S2.2-2A8 100nM
S2.2-2A8 400nM
S2.2-2F1 100nM
S2.2-2F1 400nM
S2.2-3H3 100nM
S2.2-3H3 400nM
Concentración de Línea MTX de Célula

346

FIG. 36

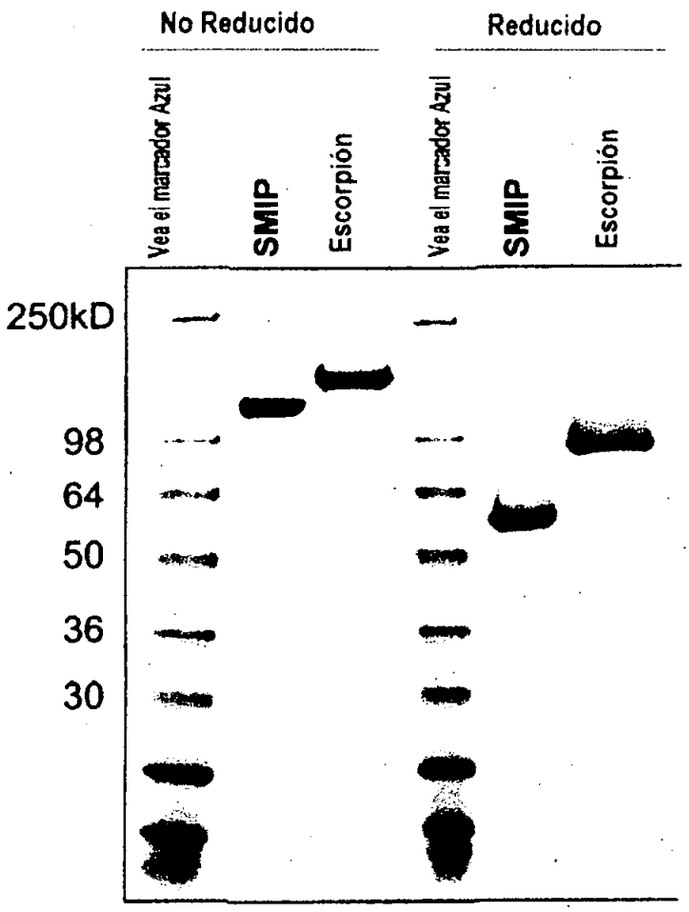

No Reducido
Reducido
Vea el marcador Azul
SMIP
Escorpión
Vea el marcador Azul
SMIP
Escorpión
250kD
98
64
50
36
30

FIG. 37

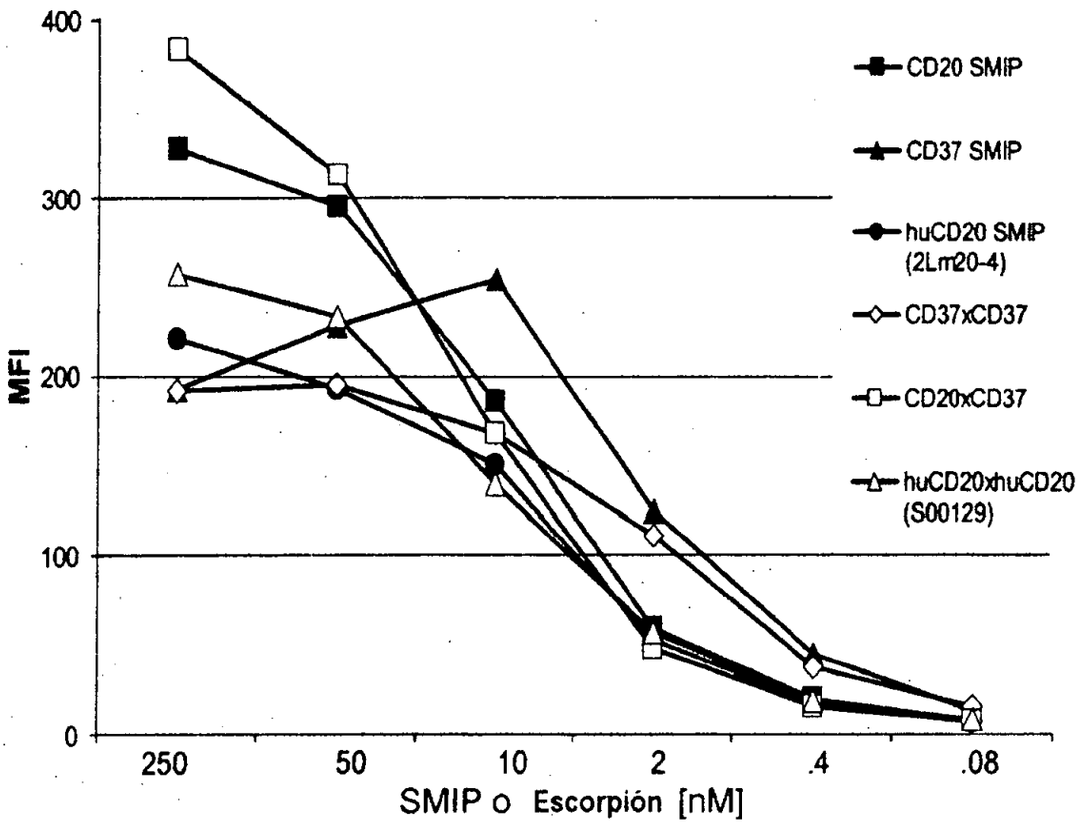

400
300
200
100
0
MFI
250
50
10
2
.4
.08
SMIP o Escorpión [nM]
CD20 SMIP
CD37 SMIP
huCD20 SMIP (2Lm20-4)
CD37xCD37
CD20xCD37
huCD20xhuCD20 (S00129)

FIG. 38

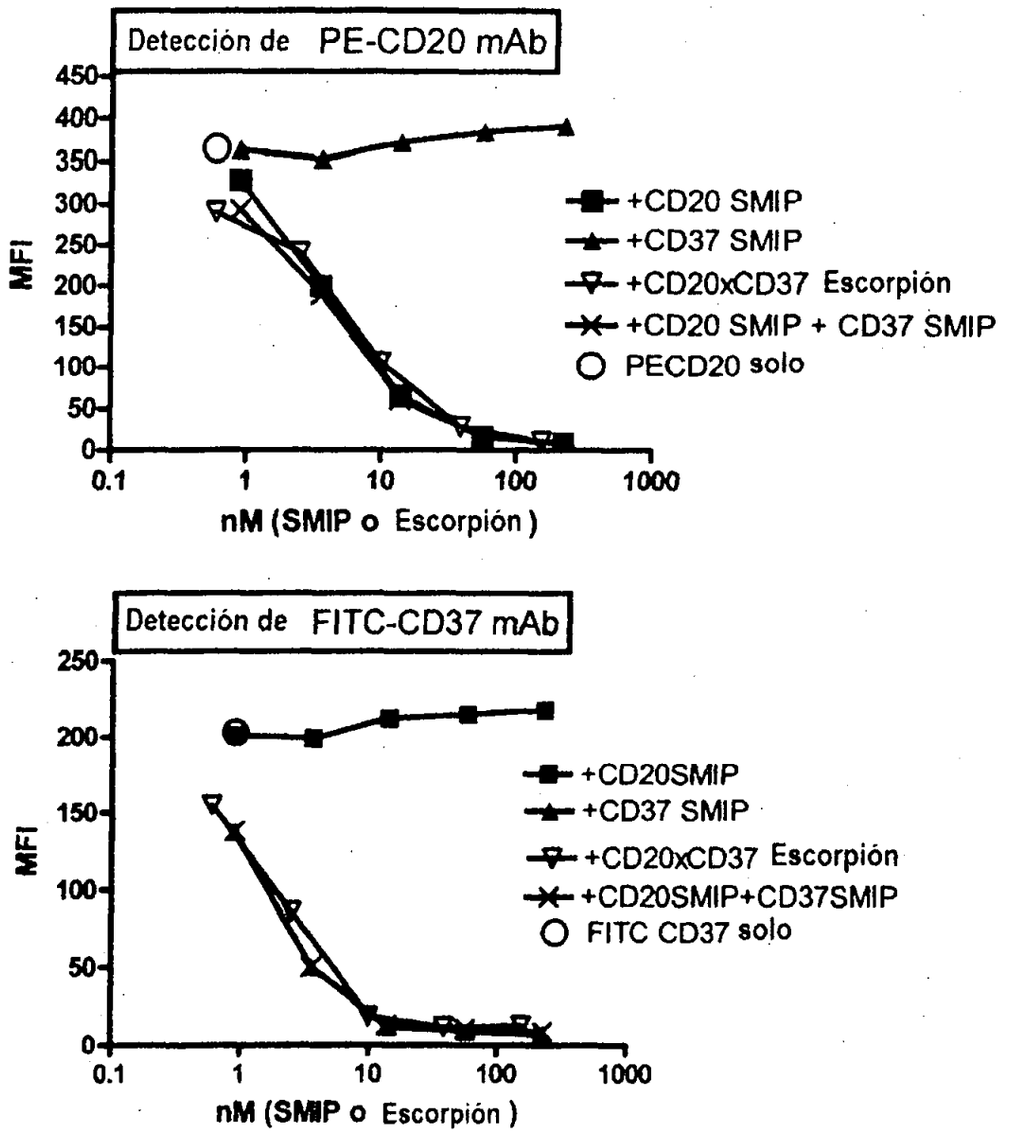
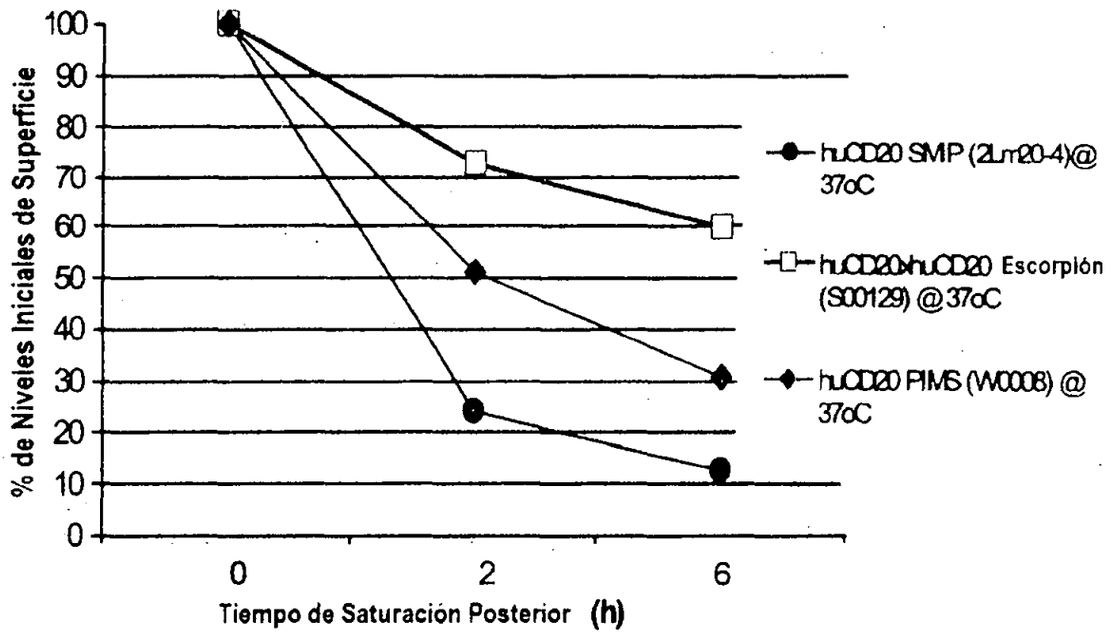

Detección de PE-CD20 mAb
MFI
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0.1
1
10
100
1000
nM (SMIP o Escorpión)
+CD20 SMIP
+CD37 SMIP
+CD20xCD37 Escorpión
+CD20 SMIP + CD37 SMIP
PECD20 solo
Detección de FITC-CD37 mAb
MFI
250
200
150
100
50
0
0.1
1
10
100
1000
nM (SMIP o Escorpión)
+CD20SMIP
+CD37 SMIP
+CD20xCD37 Escorpión
+CD20SMIP+CD37SMIP
FITC CD37 solo

FIG. 39


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% de Niveles Iniciales de Superficie
0
2
6
Tiempo de Saturación Posterior (h)
huCD20 SMP (2Lm20-4)@ 37oC
huCD20/huCD20 Escorpión (S00129) @37oC
huCD20 PIMS (W0008) @ 37oC

350

FIG. 40

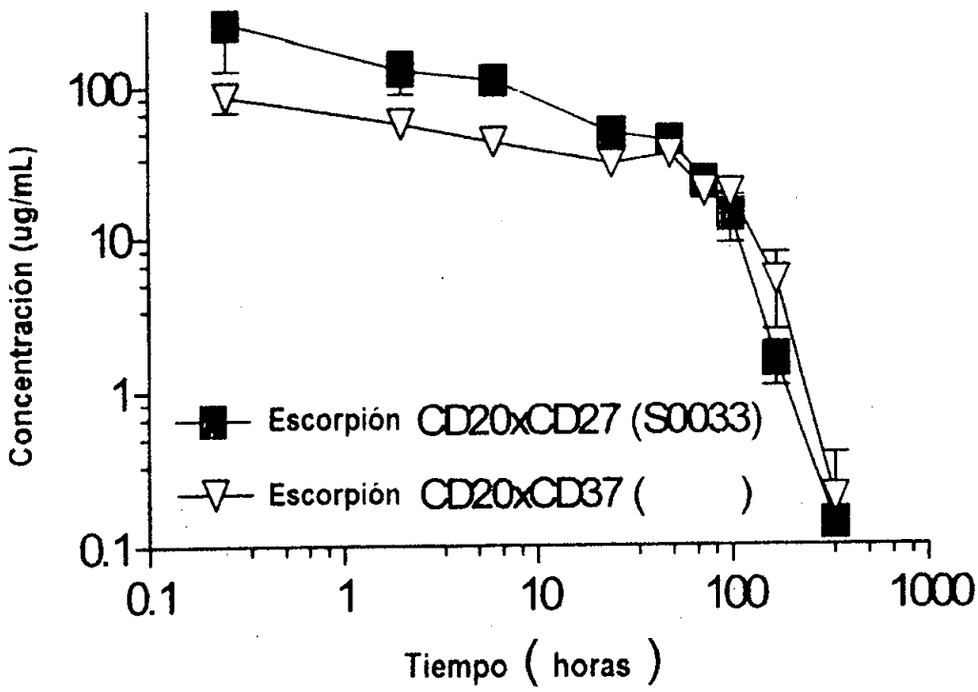

Concentración (ug/mL)
100
10
1
0.1
0.1
1
10
100
1000
Escorpión CD20xCD27 (S0033)
Escorpión CD20xCD37 ( )
Tiempo (horas)

FIG. 41

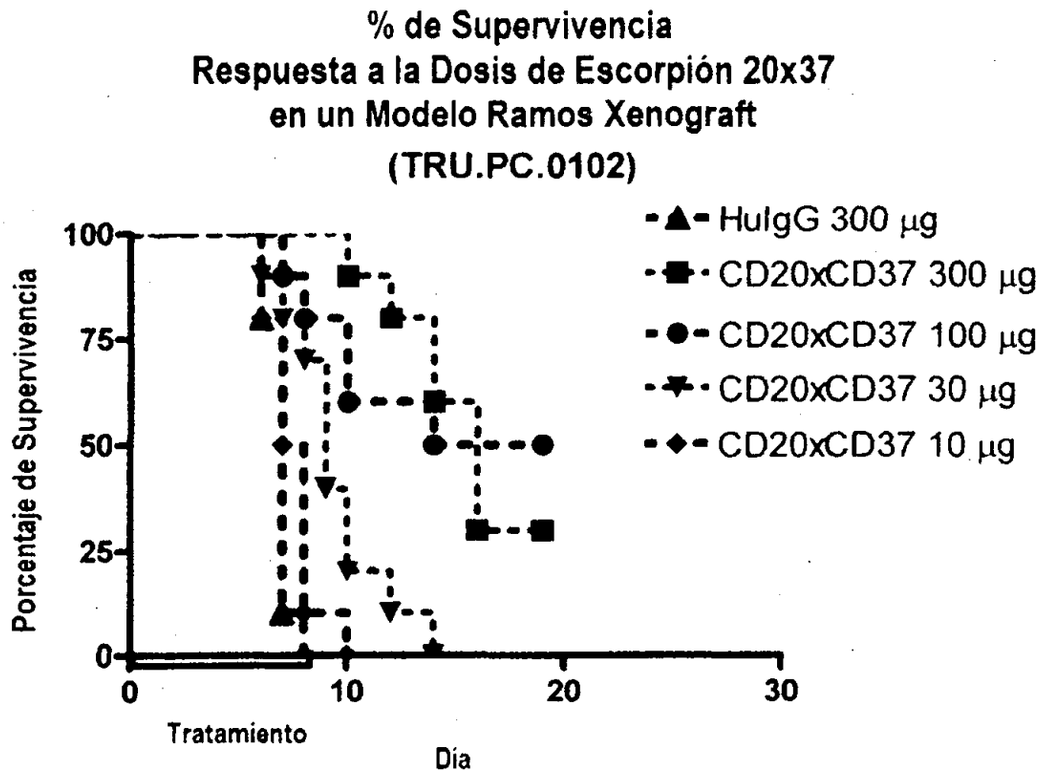
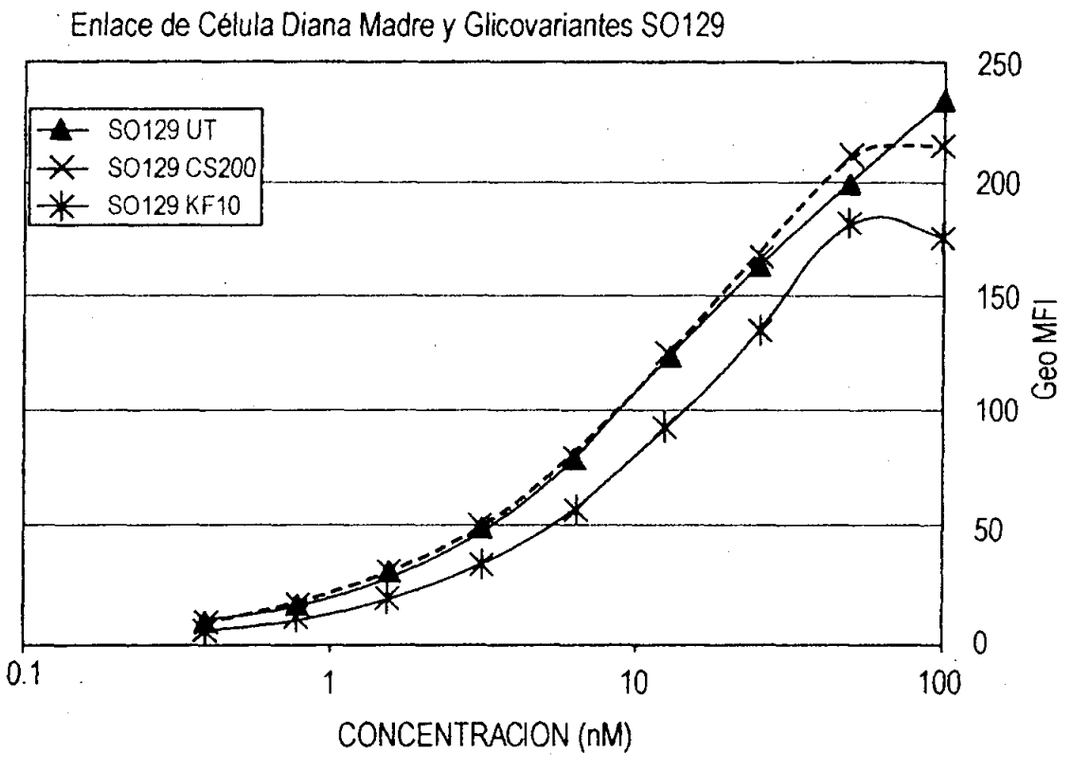

% de Supervivencia
Respuesta a la Dosis de Escorpión 20x37
en un Modelo Ramos Xenograft
(TRU.PC.0102)
HuIgG 300 µg
CD20xCD37 300 µg
CD20xCD37 100 µg
CD20xCD37 30 µg
CD20xCD37 10 µg
Porcentaje de Supervivencia
100
75
50
25
0
0
10
20
30
Tratamiento
Día

FIG. 42



WIL2S teñido con 2Im20- y +/- modificación de carbohidrato SO129
Kifunensine@10 uM (exceso), Castanospermina@200 uM

FIG. 43

Destrucción Mediada por ADCC de Linfocitos B BJAB por Escorpiones anti-CD20 y Células Efectoras Homozigotas de Baja Afinidad (CD16) efector especifico 12:5:1

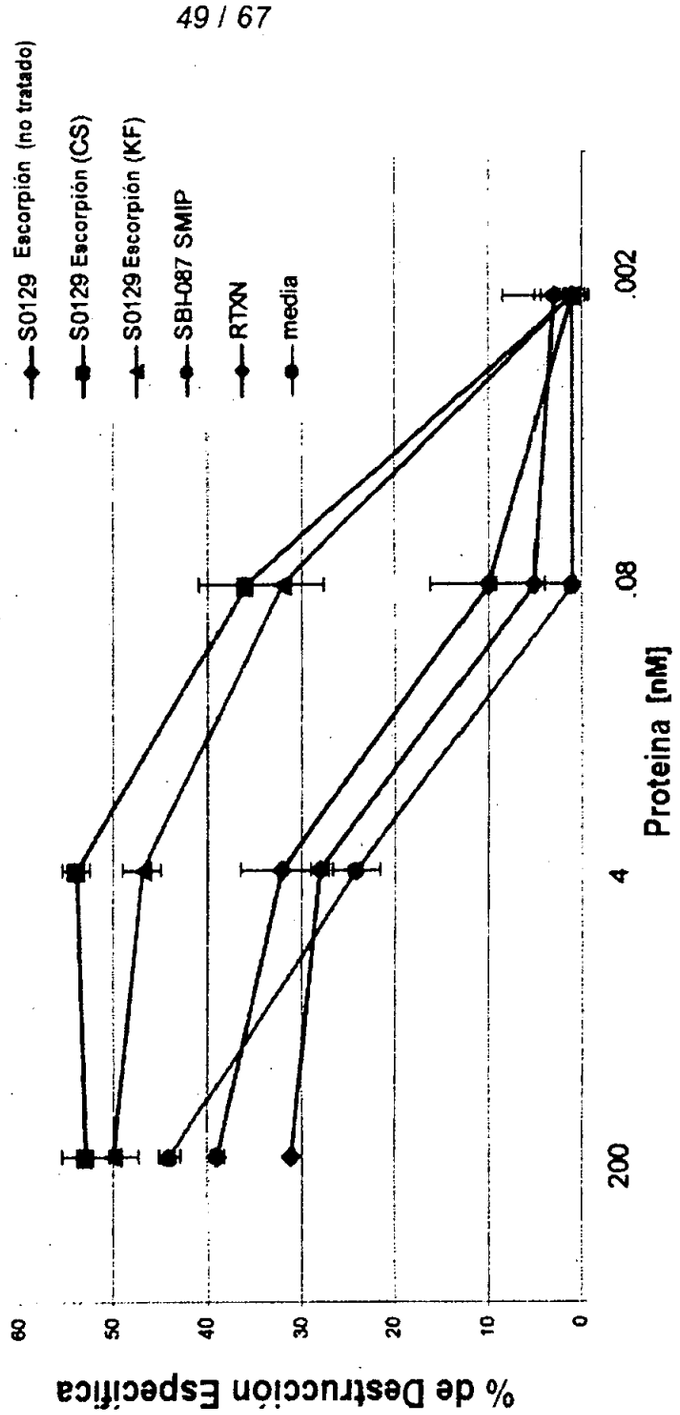


FIG. 44

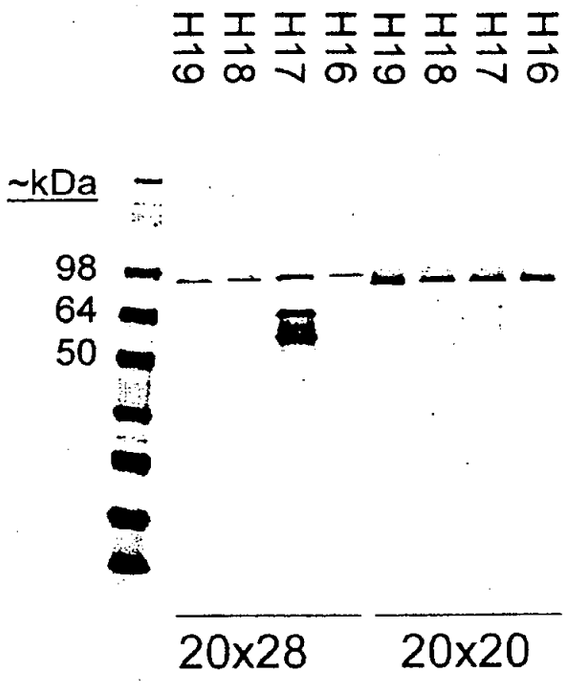


FIG. 45

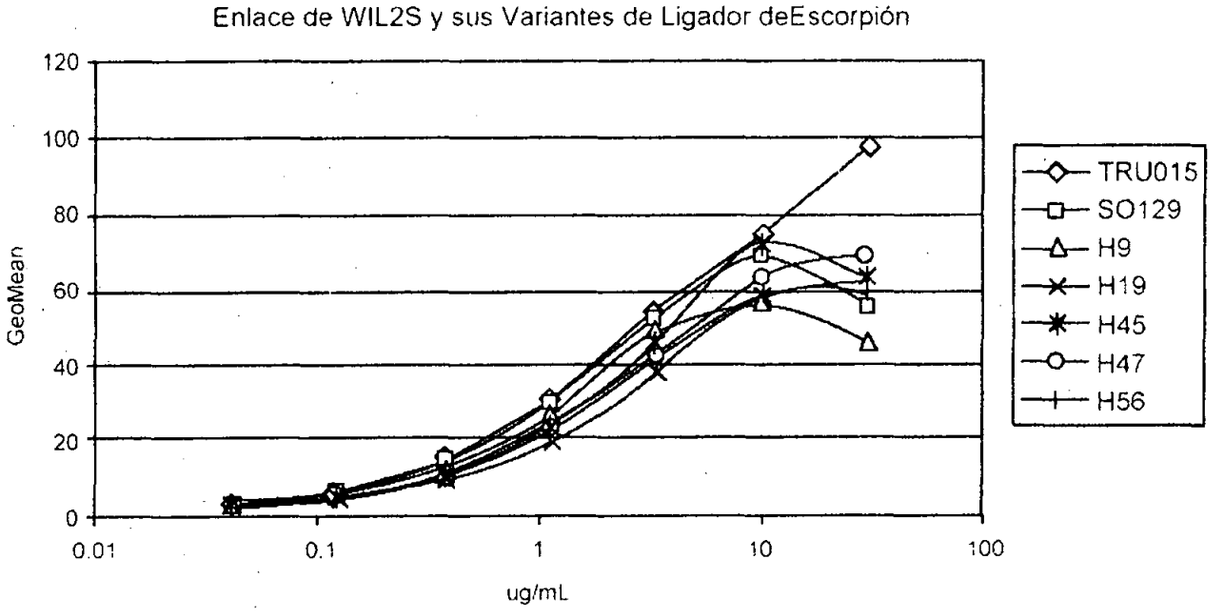

Enlace de WIL2S y sus Variantes de Ligador deEscorpión
GeoMean
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
ug/mL
TRU015
SO129
H9
H19
H45
H47
H56

FIG. 46

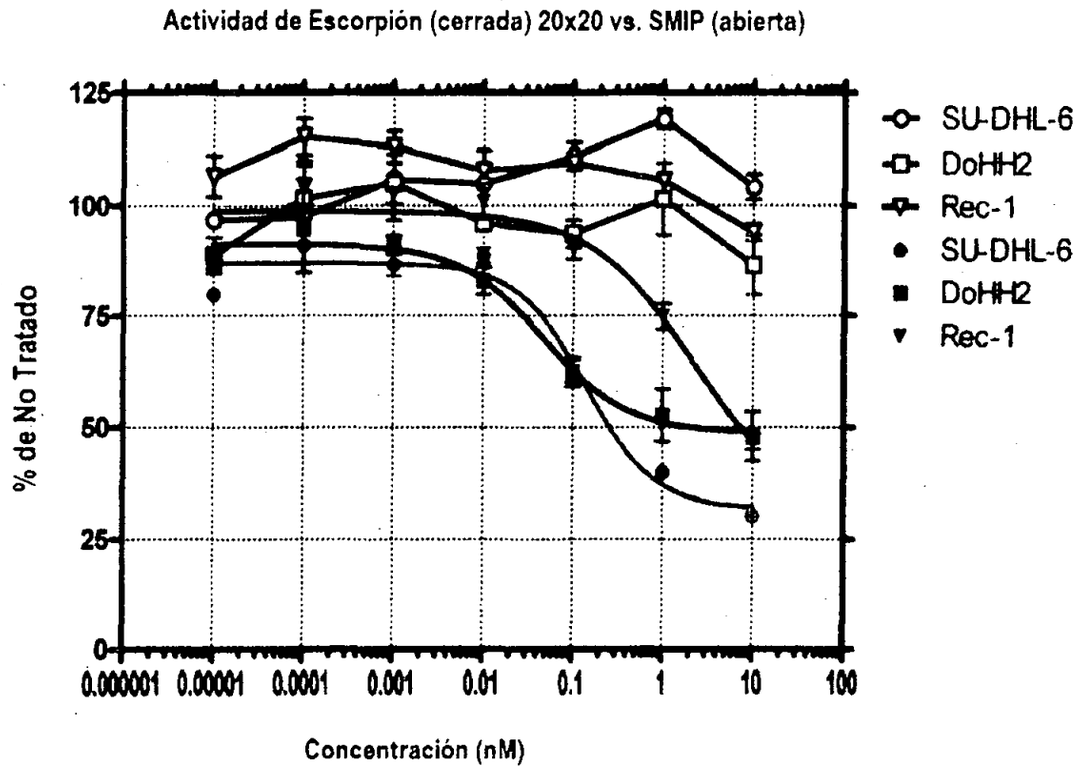

Actividad de Escorpión (cerrada) 20x20 vs. SMIP (abierta)
% de No Tratado
125
100
75
50
25
0
0.000001
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentración (nM)
SU-DHL-6
DoHH2
Rec-1
SU-DHL-6
DoHH2
Rec-1

FIG. 47

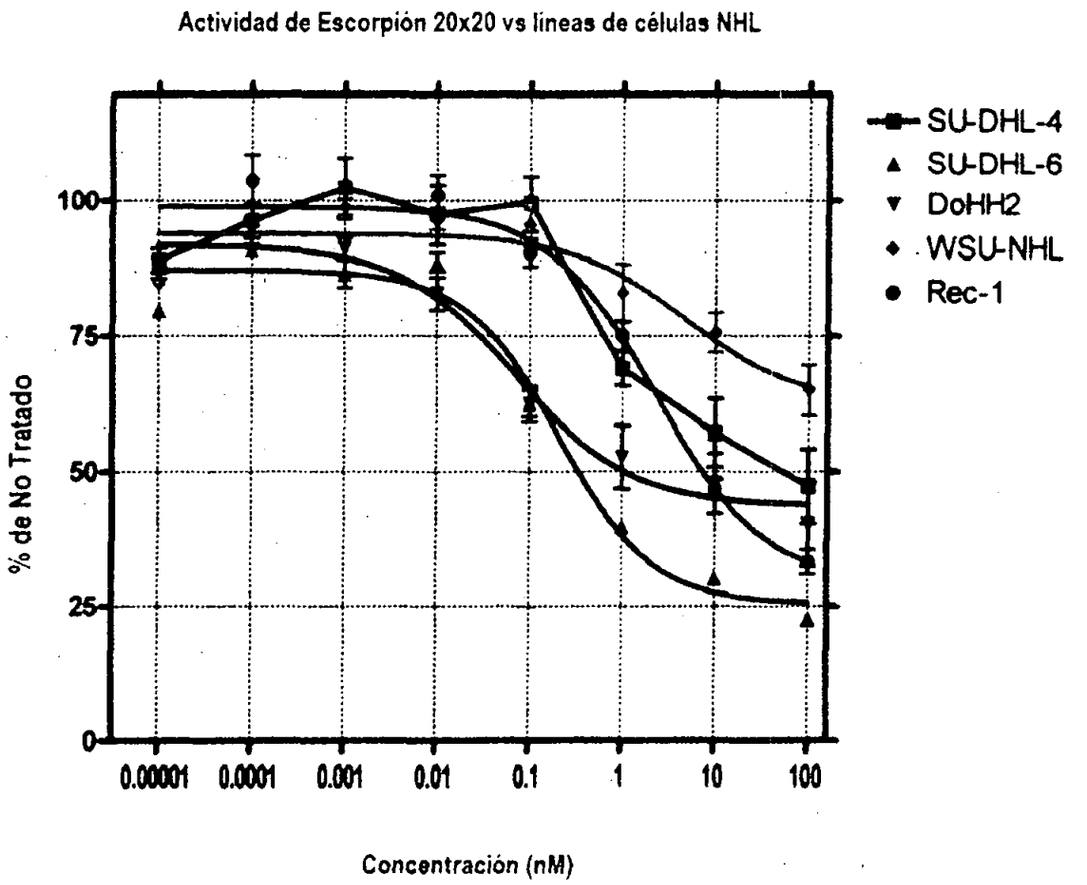

Actividad de Escorpión 20x20 vs líneas de células NHL
% de No Tratado
100
75
50
25
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentración (nM)
SU-DHL-4
SU-DHL-6
DoHH2
WSU-NHL
Rec-1

FIG. 48

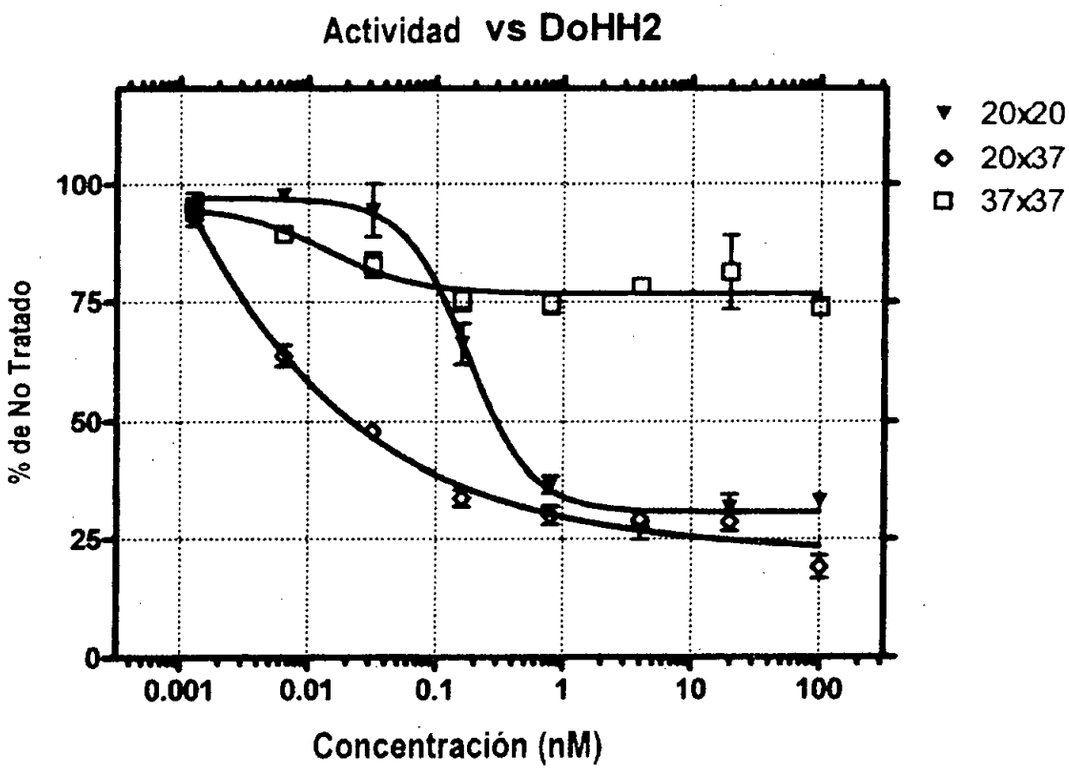
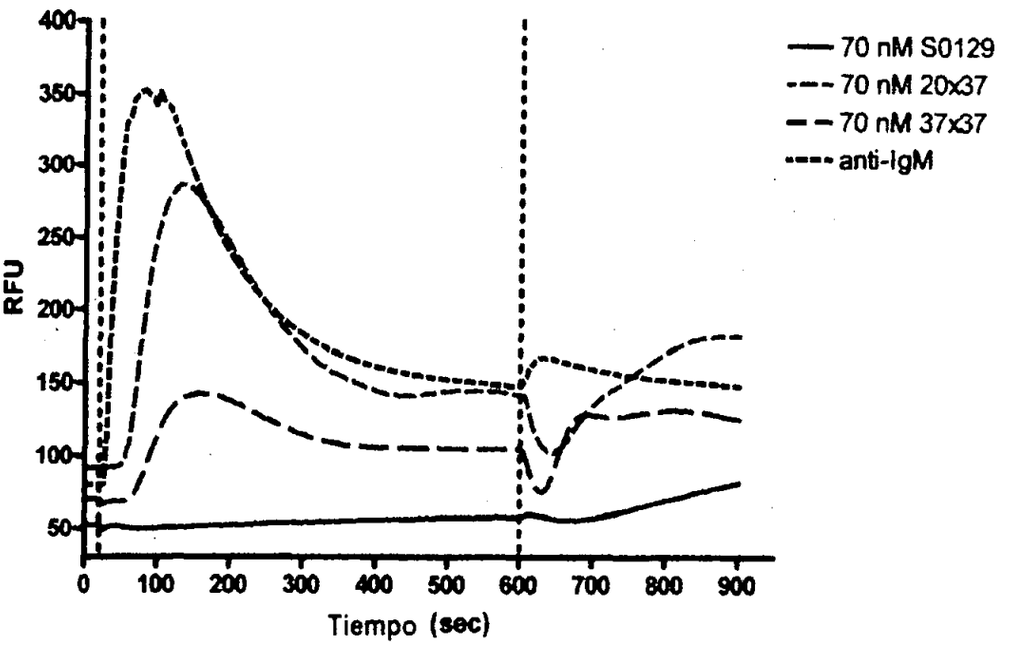

Actividad vs DoHH2
% de No Tratado
100
75
50
25
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentración (nM)
20x20
20x37
37x37

FIG. 49

Respuesta a Moléculas SU-DHL-6



360

FIG. 50

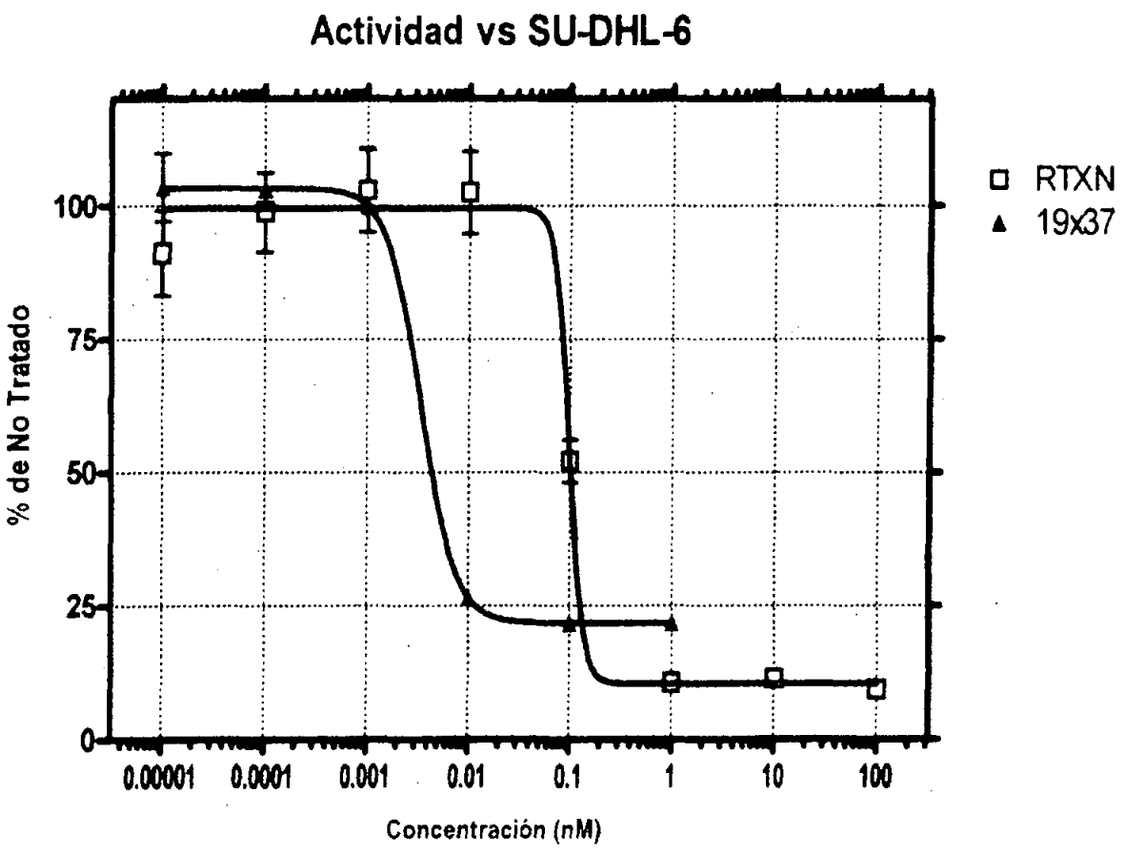

Actividad vs SU-DHL-6
% de No Tratado
100
75
50
25
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentración (nM)
RTXN
19x37

FIG. 51

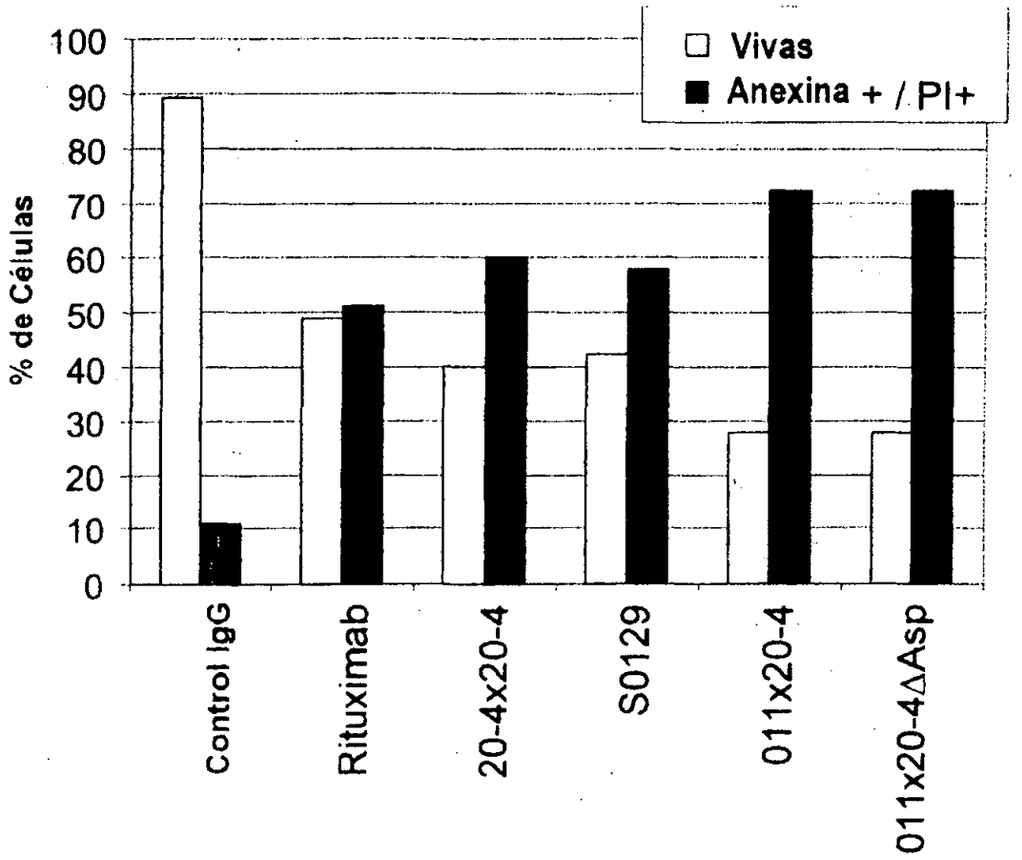

Vivas
Anexina + / PI+
% de Células
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Control IgG
Rituximab
20-4x20-4
S0129
011x20-4
011x20-4ΔAsp

FIG. 52

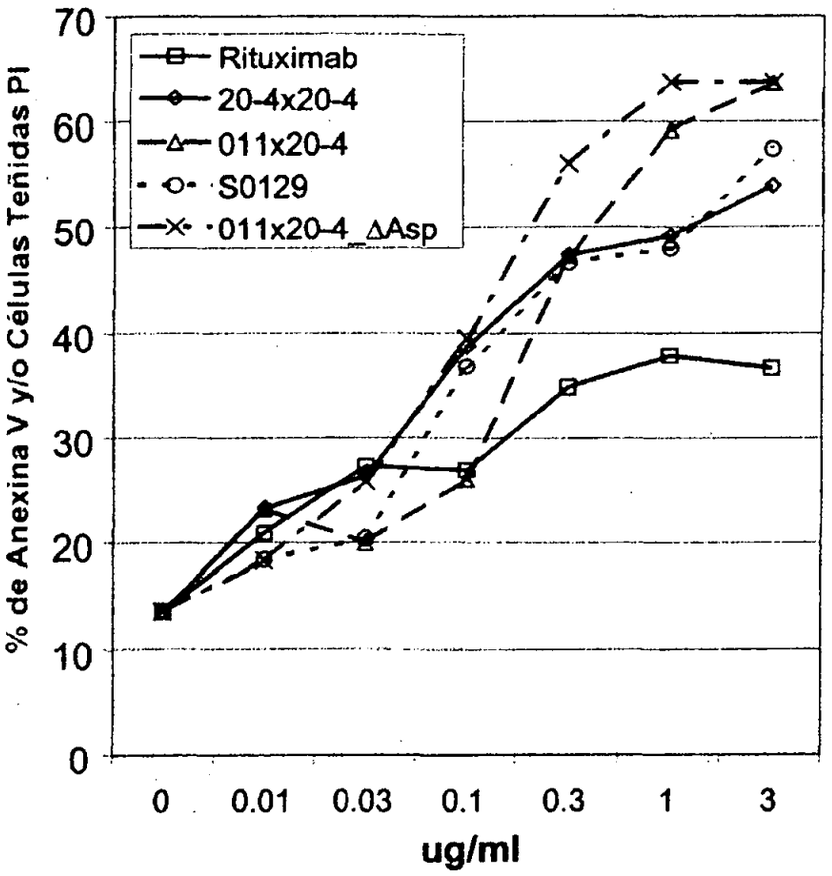

% de Anexina V y/o Células Teñidas PI
70
60
50
40
30
20
10
0
Rituximab
20-4x20-4
011x20-4
S0129
011x20-4_ΔAsp
0
0.01
0.03
0.1
0.3
1
3
ug/ml

FIG. 53

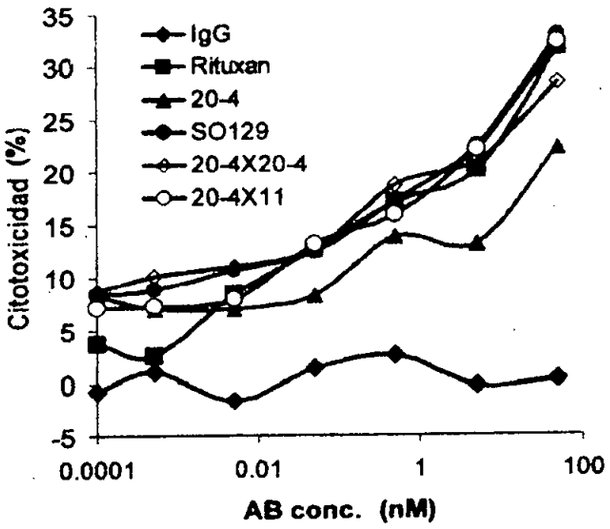

35
30
25
20
15
10
5
0
-5
Citotoxicidad (%)
IgG
Rituxan
20-4
SO129
20-4X20-4
20-4X11
0.0001
0.01
1
100
AB conc. (nM)

FIG. 54

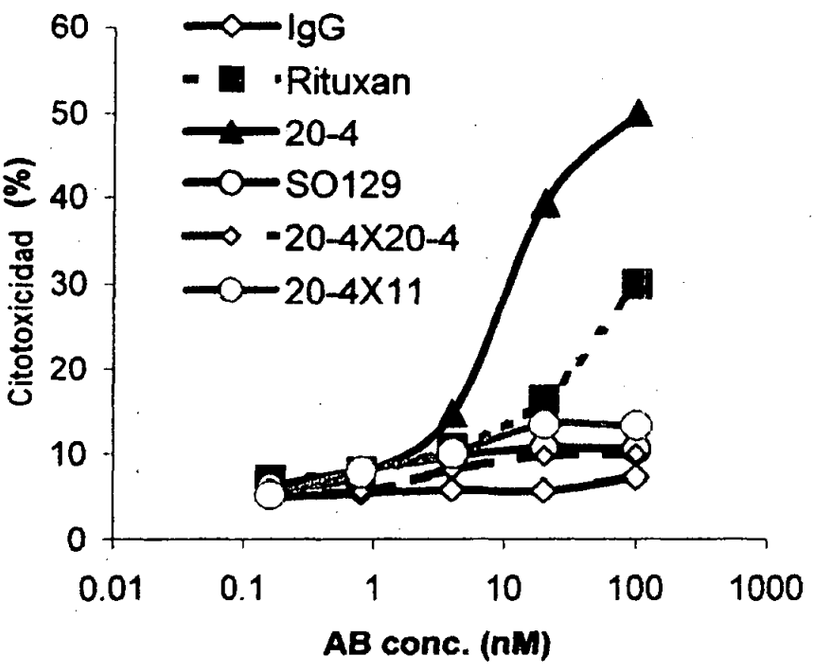

IgG
Rituxan
20-4
SO129
20-4X20-4
20-4X11
Citotoxicidad (%)
60
50
40
30
20
10
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
AB conc. (nM)

FIG. 55

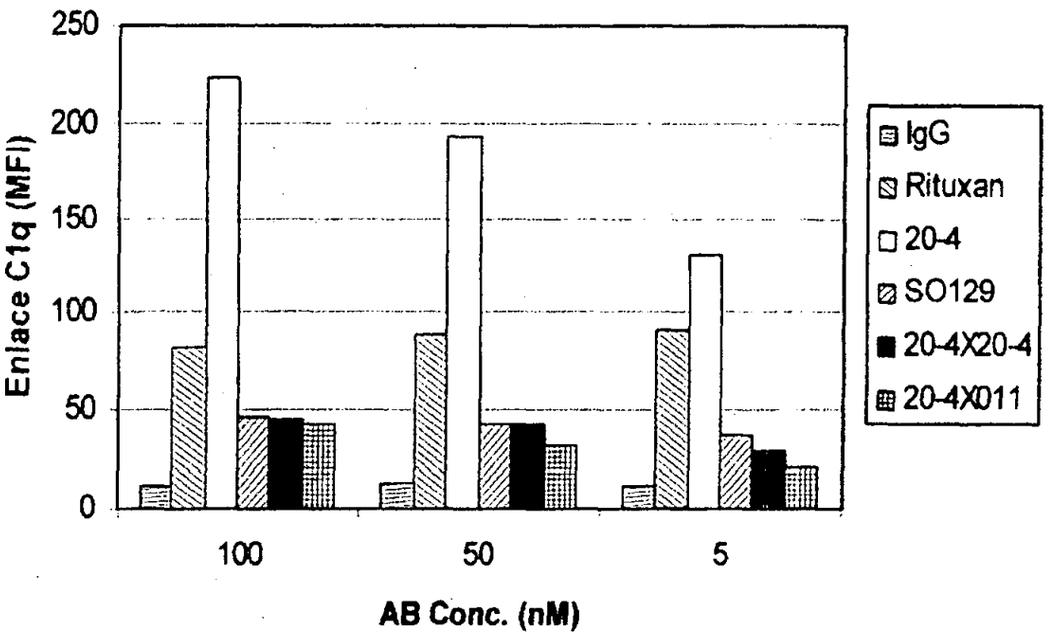

250
200
150
100
50
0
Enlace C1q (MFI)
100
50
5
AB Conc. (nM)
IgG
Rituxan
20-4
SO129
20-4X20-4
20-4X011

FIG. 56

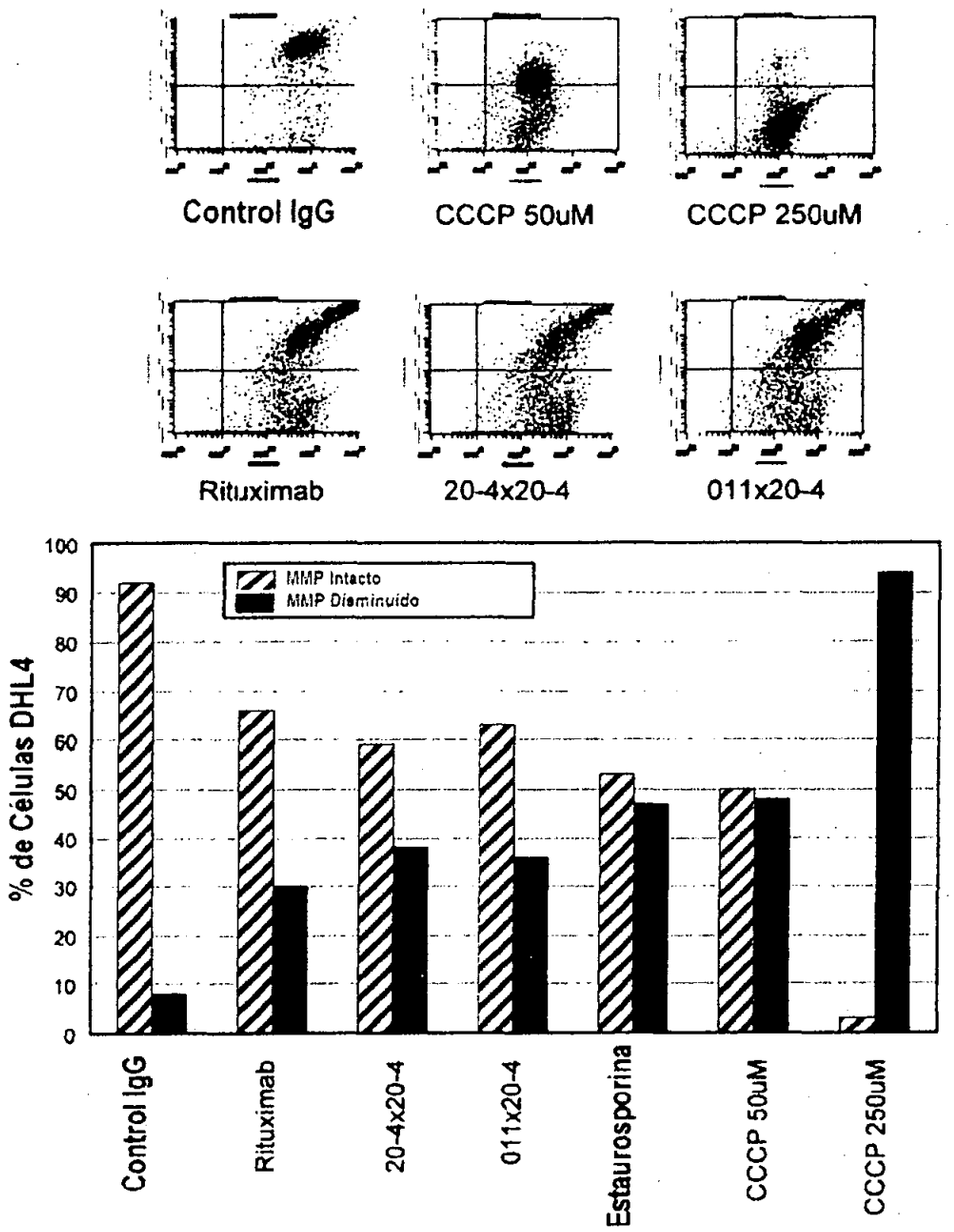

Control IgG
CCCP 50uM
CCCP 250uM
Rituximab
20-4x20-4
011x20-4
MMP Intacto
MMP Disminuido
% de Células DHL4
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Control IgG
Rituximab
20-4x20-4
011x20-4
Estaurosporina
CCCP 50uM
CCCP 250uM

FIG. 57

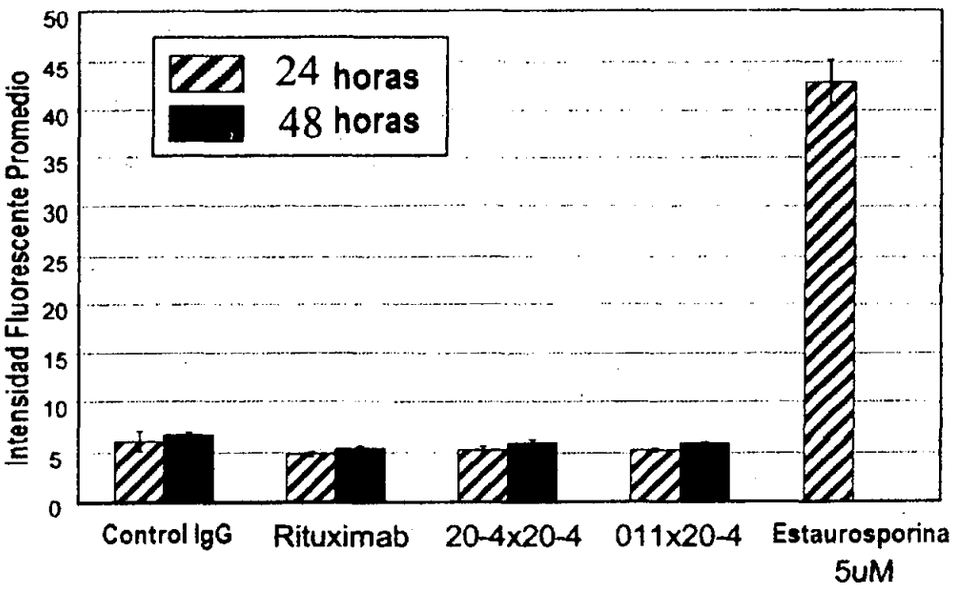
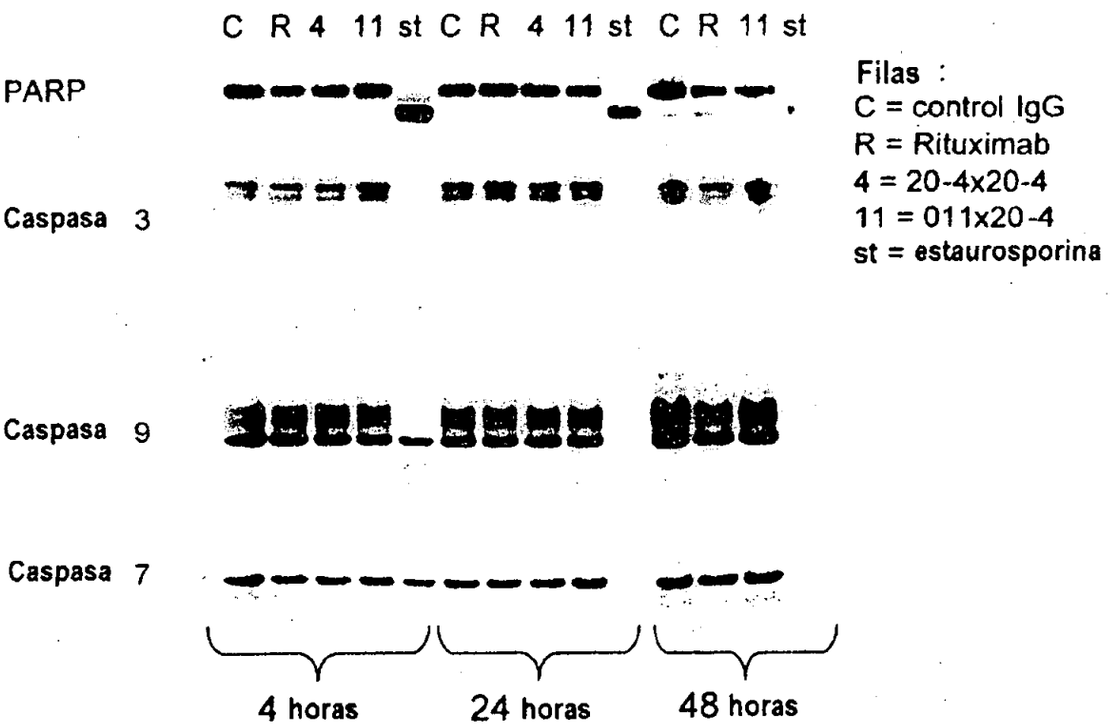

Intensidad Fluorescente Promedio
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
24 horas
48 horas
Control IgG
Rituximab
20-4x20-4
011x20-4
Estaurosporina 5uM

FIG. 58


C R 4 11 st C R 4 11 st C R 11 st
PARP
Caspasa 3
Caspasa 9
Caspasa 7
4 horas
24 horas
48 horas
Filas :
C = control IgG
R = Rituximab
4 = 20-4x20-4
11 = 011x20-4
st = estaurosporina

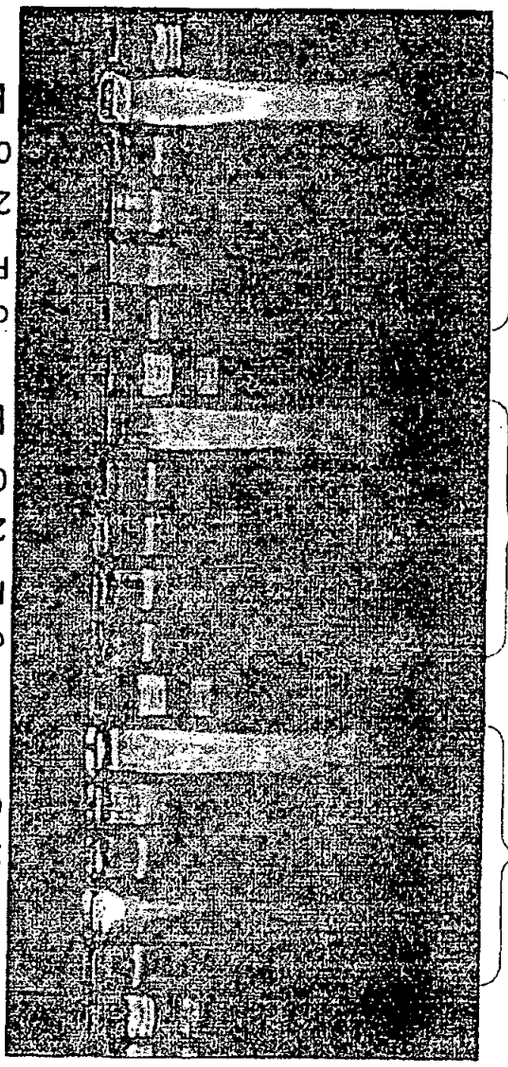
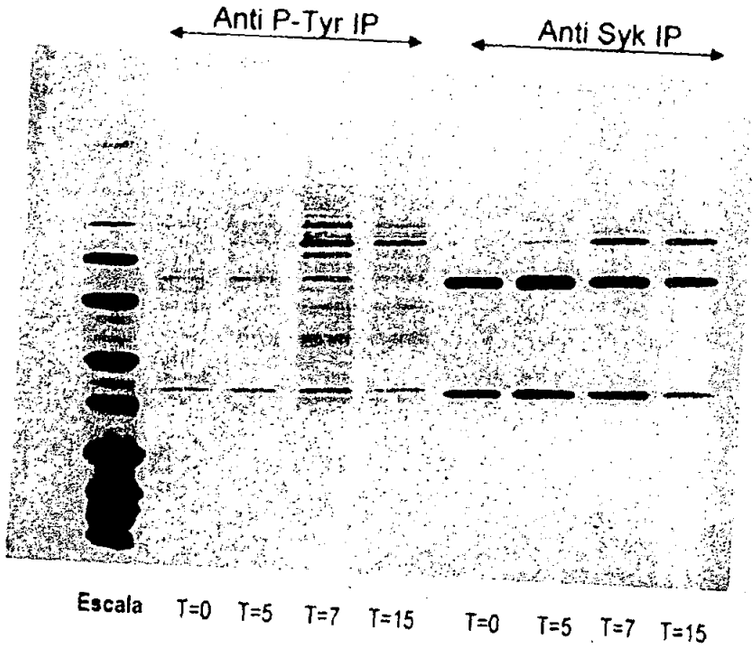

control
Rituximab
20-4x20-4
011x20-4
Estaurosporina
control
Rituximab
20-4x20-4
011x20-4
Estaurosporina
control
Rituximab
20-4x20-4
011x20-4
Estaurosporina
4 horas
24 horas
48 horas

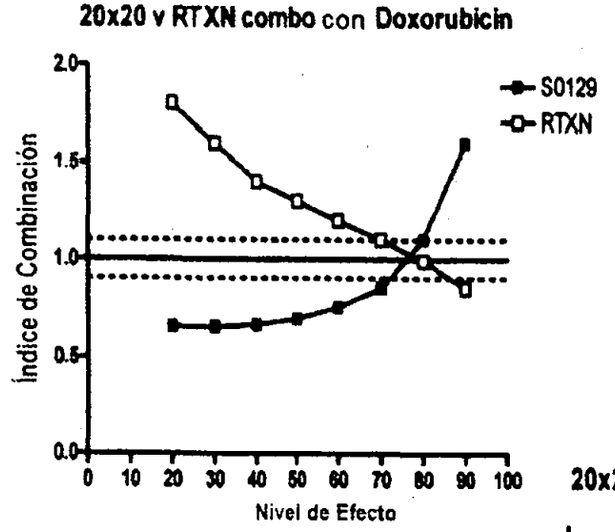
FIG. 59

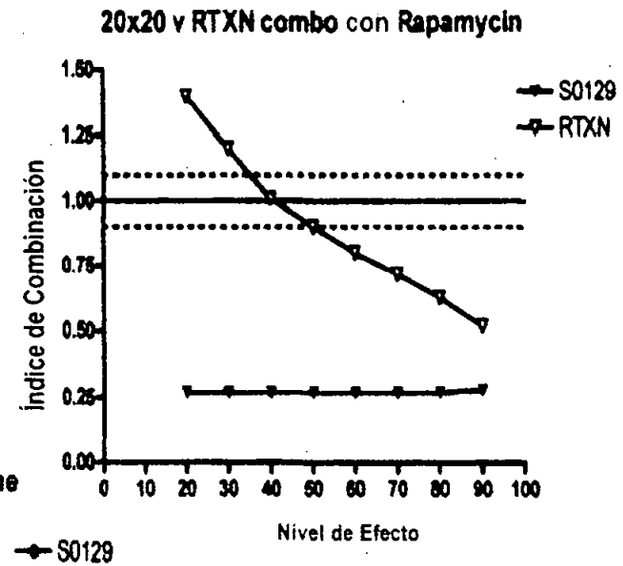
370

FIG. 60

Células DHL6 Tratadas con Escorpión 20x37




20x20 v RTXN combo con Doxorubicin
S0129
RTXN
Índice de Combinación
Nivel de Efecto
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100


20x20 v RTXN combo con Rapamycin
S0129
RTXN
Índice de Combinación
Nivel de Efecto
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1.25
1.50
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

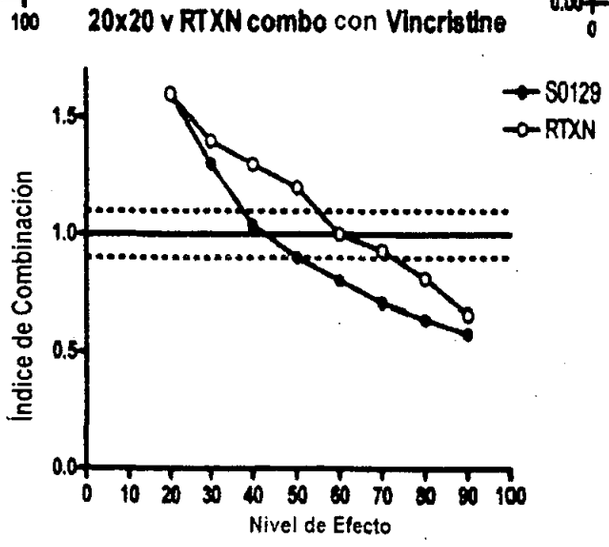

20x20 v RTXN combo con Vincristine
S0129
RTXN
Índice de Combinación
Nivel de Efecto
0.0
0.5
1.0
1.5
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

FIG. 61

242

SEQUENCE LISTING

<110> Thompson et al.

<120> Proteínas monocatenarias de enlace multivalente con función efectora

<130> 30906/41393C

<160> 379

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 795
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> anti-CD20 (2H7) LH (ADN)

<400> 1
atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaatca gtgcttcagt cataatgtcc 60

agaggacaaa ttgttctctc ccagtctcca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag 120

gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaagttaca tgcactggta ccagcagaag 180

ccaggatcct cccccaaacc ctggatttat gccccatcca acctggcttc tggagtccct 240

gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagagtggag 300

gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagtt ttaacccacc cacgttcggt 360

gctgggacca agctggagct gaaagatggc ggtggctcgg gcggtggtgg atctggagga 420

ggtgggagct ctcaggctta tctacagcag tctggggctg agtcggtgag gcctggggcc 480

tcagtgaaga tgtcctgcaa ggcttctggc tacacattta ccagttacaa tatgcactgg 540

gtaaagcaga cacctagaca gggcctggaa tggattggag ctatttatcc aggaaatggt 600

gatacttcct acaatcagaa gttcaagggc aaggccacac tgactgtaga caaatcctcc 660

agcacagcct acatgcagct cagcagcctg acatctgaag actctgcggt ctatttctgt 720

gcaagagtgg tgtactatag taactcttac tggtacttcg atgtctgggg cacagggacc 780

acggtcaccg tctct 795

<210> 2

<211> 265
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> anti-CD20 (2H7) LH (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(128)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(265)
<223> VH

<400> 2

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
260 265

<210> 3
<211> 813
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> anti-CD28 (2e12) LH (ADN)

<400> 3
atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaatca gtgcttcagt cataatgtcc 60

agaggagtcg acattgtgct cacccaatct ccagcttctt tggctgtgtc tctaggtcag 120

agagccacca tctcctgcag agccagtgaa agtgttgaat attatgtcac aagtttaatg 180

cagtggtacc aacagaaacc aggacagcca cccaaactcc tcatctctgc tgctagcaac 240

gtagaatctg gggtccctgc caggtttagt ggcagtgggt ctgggacaga ctttagcctc 300

aacatccatc ctgtggagga ggatgatatt gcaatgtatt tctgtcagca aagtaggaag 360

gttccatgga cgttcggtgg aggcaccaag ctggaaatca aacggggtgg cggtggatcc 420

ggcggaggtg ggtcgggtgg cggcggatct caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc 480

ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc acatgcaccg tctcagggtt ctcattaacc 540

ggctatggtg taaactgggt tcgccagcct ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg 600

atatggggtg atggaagcac agactataat tcagctctca aatccagact atcgatcacc 660

aaggacaact ccaagagcca agttttctta aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca 720

gccagatact actgtgcccg agatggttat agtaactttc attactatgt tatggactac 780

tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tct 813

<210> 4
<211> 271
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> anti-CD28 (2e12) LH (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(23)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(135)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (136)..(150)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (151)..(271)
<223> VH

<400> 4

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Val Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
20 25 30

Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala
35 40 45

Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln
50 55 60

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn
65 70 75 80

Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
85 90 95

Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met
100 105 110

Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly
115 120 125

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly
145 150 155 160

Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly
165 170 175

Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly
180 185 190

Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp
195 200 205

Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser
210 215 220

Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr
225 230 235 240

Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr

245 250 255

Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
260 265 270

<210> 5
<211> 828
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> anti-CD28 (2e12) HL (ADN)

<400> 5
atggatttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaatca gtgcttcagt cataatgtcc 60

agaggagtcc aggtgcagct gaaggagtca ggacctggcc tggtggcgcc ctcacagagc 120

ctgtccatca catgcaccgt ctcagggttc tcattaaccg gctatggtgt aaactgggtt 180

cgccagcctc caggaaaggg tctggagtgg ctgggaatga tatggggtga tggaagcaca 240

gactataatt cagctctcaa atccagacta tcgatcacca aggacaactc caagagccaa 300

gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaact gatgacacag ccagatacta ctgtgcccga 360

gatggttata gtaactttca ttactatgtt atggactact ggggtcaagg aacctcagtc 420

accgtctcct ctgggggtgg aggctctggt ggcggtggat ccggcggagg tgggtcgggt 480

ggcggcggat ctgacattgt gctcacccaa tctccagctt ctttggctgt gtctctaggt 540

cagagagcca ccatctcctg cagagccagt gaaagtgttg aatattatgt cacaagttta 600

atgcagtggt accaacagaa accaggacag ccacccaaac tcctcatctc tgctgctagc 660

aacgtagaat ctggggtccc tgccaggttt agtggcagtg ggtctgggac agactttagc 720

ctcaacatcc atcctgtgga ggaggatgat attgcaatgt atttctgtca gcaaagtagg 780

aaggttccat ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa tcaaacgt 828

<210> 6
<211> 276
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> anti-CD28 (2e12) HL (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(23)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(144)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(164)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (165)..(276)
<223> VL

<400> 6

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Val Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro
20 25 30

Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser
35 40 45

Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro
50 55 60

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr
65 70 75 80

Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn
85 90 95

Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp
100 105 110

Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr
115 120 125

Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
145 150 155 160

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
165 170 175

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
180 185 190

Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
195 200 205

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser
210 215 220

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
225 230 235 240

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys
245 250 255

Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
260 265 270

Glu Ile Lys Arg
275

<210> 7
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> Heavy Chain GSP1

<400> 7
aggtgctgga ggggacagtc actgagctgc 30

<210> 8
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> Nested Heavy Chain

<400> 8
gtcacwgtca ctgrctcagg gaartagc 28

<210> 9
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> Light Chain GSP1

<400> 9
gggtgctgct catgctgtag gtgctgtctt tgc 33

<210> 10
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> Nested Light Chain

<400> 10
caagaagcac acgactgagg cacctccaga tg 32

<210> 11
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> Race Abridged Anchor Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(25)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(30)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(35)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 11
ggccacgcgt cgactagtac gggnngggnn gggnng 36

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> T7 primer

<400> 12
gtaatacgac tcactatagg 20

<210> 13
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> M13 reverse primer

<400> 13
caggaaacag ctatgacc 18

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> human IgG1 hinge domain

<400> 14

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 15
<211> 46
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> hVK3L-F3H3

<400> 15
gcgataaagc ttgccgccat ggaagcacca gcgcagcttc tcttcc 46

<210> 16
<211> 50
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> hVK3LF2

<400> 16
accagcgcag cttctcttcc tcctgctact ctggctccca gataccaccg 50

<210> 17
<211> 45
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> hVK3LF12HVL

<400> 17
ggctcccaga taccaccggt caaattgttc tctcccagtc tccag 45

<210> 18

<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 2H7VHNheF

<400> 18
gcgatagcta gccaggctta tctacagcag tctgg 35

<210> 19
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> G4SNheR

<400> 19
gcgatagcta gccccacctc ctccagatcc accaccgccc gag 43

<210> 20
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 015VHXhoR

<400> 20
gcgtactcga ggagacggtg accgtggtcc ctgtg 35

<210> 21
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> G1HC-Xho

<400> 21
gcagtctcga gcgagcccaa atcttgtgac aaaactc 37

<210> 22
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> G1H-S-Xho

<400> 22
gcagtctcga gcgagcccaa atcttctgac aaaactc 37

<210> 23
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> CH3REcoR1

<400> 23
gcgtgagaat tcttacccgg agacagggag aggctc 36

<210> 24
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> G1 XBZ-R

<400> 24
gcgacgtcta gagtcattta cccggagaca gg 32

<210> 25
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> G4SLinkR1-S

<400> 25
aattatggtg gcggtggctc gggcggtggt ggatctggag gaggtgggag tggg 54

<210> 26
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> G4SLinkR1-AS

<400> 26
aattcccact cccacctcct ccagatccac caccgcccga gccaccgcca ccat 54

<210> 27
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 2E12VLXbaR

<400> 27
gcgtgtctag attaacgttt gatttccagc ttggtg 36

<210> 28
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 2E12VLR1F

<400> 28
gcgatgaatt ctgacattgt gctcacccaa tctcc 35

<210> 29
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 2E12VHR1F

<400> 29
gcgatgaatt ctcaggtgca gctgaaggag tcag 34

<210> 30
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 2E12VHXbaR

<400> 30
gcgagtctag attaagagga gacggtgact gaggttc 37

<210> 31
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 2e12VHdXbaF1

<400> 31
gggtctggag tggctgggaa tgatatg 27

<210> 32
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 2e12VHdXbaR1

<400> 32
attcccagcc actccagacc ctttcctg 28

<210> 33
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> IgBsrG1F

<400> 33
gagaaccaca ggtgtacacc ctg 23

<210> 34
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> IgBsrG1R

<400> 34
gcagggtgta cacctgtggt tctcg 25

<210> 35
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> M13R

<400> 35
caggaaacag ctatgac 17

<210> 36

<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> M13F

<400> 36
gtaaaacgac ggccagtg 18

<210> 37
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> T7

<400> 37
gtaatacgac tcactatagg 20

<210> 38
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> pD18F-17

<400> 38
aactagagaa cccactg 17

<210> 39
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> pD18F-20

<400> 39
gctaactaga gaacccactg 20

<210> 40
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> pD18F-1

<400> 40
atacgactca ctataggg 18

<210> 41
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> pD18R-s

<400> 41
gctctagcat ttaggtgac 19

<210> 42
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> CH3seqF1

<400> 42
catgaggctc tgcacaac 18

<210> 43
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> CH3seqF2

<400> 43
cctctacagc aagctcac 18

<210> 44
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> CH3seqR1

<400> 44
ggttcttggt cagctcatc 19

<210> 45
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> CH3seqR2

<400> 45
gtgagcttgc tgtagagg 18

<210> 46
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> L1-11R

<400> 46
gcgatagaat tcccagatcc accaccgccc gagccaccgc caccataatt c 51

<210> 47
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> L1-6R

<400> 47
gcgatagaat tcccagagcc accgccacca taattc 36

<210> 48
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> L3R

<400> 48
gcgtatgaat tccccgagcc accgccaccc ttacccggag acagg 45

<210> 49
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> L4R

<400> 49
gcgtatgaat tcccagatcc accaccgccc gagccaccgc cacccttac 49

<210> 50
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> L5R

<400> 50
gcgtatgaat tcccgctgcc tcctccccca gatccaccac cgcc 44

<210> 51
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> IgBsrG1F

<400> 51
gagaaccaca ggtgtacacc ctg 23

<210> 52
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> L-CPPCPR

<400> 52
gcgatagaat tcggacaagg tggacacccc ttacccggag acagggagag 50

<210> 53
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> G281LH-NheR

<220>
<223> Synthetic primer

<400> 53
actgctgcag ctggaccgcg ctagctccgc cgccacccga c 41

<210> 54

<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> G281LH-NheF

<400> 54
ggcggagcta gcgcggtcca gctgcagcag tctggacctg 40

<210> 55
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> G281-LH-LPinF

<400> 55
gcgatcaccg gtgacatcca gatgactcag tctccag 37

<210> 56
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> G281-LH-HXhoR

<400> 56
gcgatactcg aggagacggt gactgaggtt ccttgac 37

<210> 57
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> G281-LH-LEcoF

<400> 57
gcgatcgaat tcagacatcc agatgactca gtctccag 38

<210> 58
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> G281-LH-HXbaR

<400> 58
gcgattctag attaggaaga gacggtgact gaggttcctt gac 43

<210> 59
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> G281-HL-HF

<400> 59
gcgataaccg gtgcggtcca gctgcagcag tctggac 37

<210> 60
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> G281-HL-HR3

<400> 60
gacccaccac cgcccgagcc accgccacca gaagagacgg tgactgaggt tc 52

<210> 61
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> G281-HL-HR2

<400> 61
actcccgcct cctcctgatc cgccgccacc cgacccacca ccgcccgag 49

<210> 62
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> G281-HL-HNheR

<400> 62
gagtcatctg gatgtcgcta gcactcccgc ctcctcctga tc 42

<210> 63
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> G281-HL-LNheF

<400> 63
atcaggagga ggcgggagtg ctagcgacat ccagatgact cagtc 45

<210> 64
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> G281-HL-LXhoR

<400> 64
gcgatactcg agcctttgat ctccagttcg gtgcctc 37

<210> 65
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> G281-HL-LXhoR

<400> 65
gcgatatcta gactcaacct ttgatctcca gttcggtgcc tc 42

<210> 66
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> G281-HL-EcoF

<400> 66
gcgatagaat tcgcggtcca gctgcagcag tctggac 37

<210> 67
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-LH-LF1

<400> 67
gcgtatgaac cggtgacatc cagatgacac agactacatc 40

<210> 68
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-LF2

<400> 68
atccagatga cacagactac atcctccctg tctgcctctc tgggagacag 50

<210> 69
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-LF3

<400> 69
gtctgcctct ctgggagaca gagtcaccat cagttgcagg gcaagtcagg ac 52

<210> 70
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-LF4

<400> 70
gttgcagggc aagtcaggac attcgcaatt atttaaactg gtatcagcag 50

<210> 71
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-LF5

<400> 71
atttaaactg gtatcagcag aaaccagatg gaactgttaa actcctgatc 50

<210> 72
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-LF6

<400> 72
gaactgttaa actcctgatc tactacacat caagattaca ctcaggagtc 50

<210> 73
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-LF7

<400> 73
caagattaca ctcaggagtc ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctgga ac 52

<210> 74
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-LR7

<400> 74
caggttggca atggtgagag aataatctgt tccagaccca ctgccactga ac 52

<210> 75
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>

<223> 194-LR6

<400> 75
gcaaaagtaa gtggcaatat cttctggttg caggttggca atggtgagag 50

<210> 76
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-LR5

<400> 76
gaacgtccac ggaagcgtat taccctgttg gcaaaagtaa gtggcaatat c 51

<210> 77
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-LR4

<400> 77
cgtttggtta ccagtttggt gcctccaccg aacgtccacg gaagcgtatt ac 52

<210> 78
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-LR3

<400> 78
accaccgccc gagccaccgc caccccgttt ggttaccagt ttggtg 46

<210> 79
<211> 50
<212> ADN

133314

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-LR2

<400> 79
gctagcgctc ccacctcctc cagatccacc accgcccgag ccaccgccac 50

<210> 80
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-LH-LR1

<400> 80
gttgcagctg gacctcgcta gcgctcccac ctcctccaga tc 42

<210> 81
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-LH-HF1

<400> 81
gatctggagg aggtgggagc gctagcgagg tccagctgca acagtctgga cctg 54

<210> 82
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-HF2

<400> 82

agctgcaaca gtctggacct gaactggtga agcctggagc ttcaatgaag 50

<210> 83
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-HF3

<400> 83
agcctggagc ttcaatgaag atttcctgca aggcctctgg ttactcattc 50

<210> 84
<211> 53
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-HF4

<400> 84
gcaaggcctc tggttactca ttcactggct acatcgtgaa ctggctgaag cag 53

<210> 85
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-HF5

<400> 85
atcgtgaact ggctgaagca gagccatgga aagaaccttg agtggattgg ac 52

<210> 86
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-HF6

<400> 86
gaaccttgag tggattggac ttattaatcc atacaaaggt cttactacct ac 52

<210> 87
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-HR6

<400> 87
aatgtggcct tgcccttgaa tttctggttg taggtagtaa gacctttgta tg 52

<210> 88
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-HR5

<400> 88
catgtaggct gtgctggatg acttgtctac agttaatgtg gccttgccct tg 52

<210> 89
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-HR4

<400> 89
actgcagagt cttcagatgt cagactgagg agctccatgt aggctgtgct ggatg 55

<210> 90
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-HR3

<400> 90
accatagtac ccagatcttg cacagtaata gactgcagag tcttcagatg tc 52

<210> 91
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-HR2

<400> 91
gcgccccaga catcgaagta ccagtccgag tcaccatagt acccagatct tg 52

<210> 92
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-LH-HR1

<400> 92
gcgaatactc gaggagacgg tgaccgtggt ccctgcgccc cagacatcga ag 52

<210> 93
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>

<223> 194-HL-HF1

<400> 93
gcgtatgaac cggtgaggtc cagctgcaac agtctggacc tg 42

<210> 94
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-HL-HR1

<400> 94
accgccacca gaggagacgg tgaccgtggt ccctgcgccc cagacatcga agtac 55

<210> 95
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-HL-HR0

<400> 95
acctcctcca gatccaccac cgcccgagcc accgccacca gaggagacgg tg 52

<210> 96
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-HL-LF1

<400> 96
gcgggggagg tggcagtgct agcgacatcc agatgacaca gactacatc 49

<210> 97
<211> 34
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-HL-LR3Xho

<400> 97
gcgaatactc gagcgtttgg ttaccagttt ggtg 34

<210> 98
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-HL-LR3Xba

<400> 98
gcgatatcta gattaccgtt tggttaccag tttggtg 37

<210> 99
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-HL-HF1R1

<400> 99
gcgtatgaga attcagaggt ccagctgcaa cagtctggac ctg 43

<210> 100
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-LH-LF1R1

<400> 100

gcgtatgaga attctgacat ccagatgaca cagactacat c 41

<210> 101
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> 194-LH-HR1Xba

<400> 101
gcgtatctag attaggagac ggtgaccgtg gtccctgcgc cccagacatc gaag 54

<210> 102
<211> 725
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> G28-1 VLVH (ADN)

<400> 102
accggtgaca tccagatgac tcagtctcca gcctccctat ctgcatctgt gggagagact 60

gtcaccatca catgtcgaac aagtgaaaat gtttacagtt atttggcttg gtatcagcag 120

aaacagggaa aatctcctca gctcctggtc tcttttgcaa aaaccttagc agaaggtgtg 180

ccatcaaggt tcagtggcag tggatcaggc acacagtttt ctctgaagat cagcagcctg 240

cagcctgaag attctggaag ttatttctgt caacatcatt ccgataatcc gtggacgttc 300

ggtggaggca ccgaactgga gatcaaaggt ggcggtggct cgggcggtgg tgggtcgggt 360

ggcggcggat ctgctagcgc agtccagctg cagcagtctg gacctgagct ggaaaagcct 420

ggcgcttcag tgaagatttc ctgcaaggct tctggttact cattcactgg ctacaatatg 480

aactgggtga agcagaataa tggaaagagc cttgagtgga ttggaaatat tgatccttat 540

tatggtggta ctacctacaa ccggaagttc aagggcaagg ccacattgac tgtagacaaa 600

tcctccagca cagcctacat gcagctcaag agtctgacat ctgaggactc tgcagtctat 660

tactgtgcaa gatcggtcgg ccctatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 720

<210> 103
<211> 239
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> G-28-1 VLVH (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(107)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (108)..(124)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (125)..(239)
<223> VH

<400> 103

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Ala Val Gln Leu
115 120 125

Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile
130 135 140

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn Met Asn Trp
145 150 155 160

Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asp
165 170 175

Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys Gly Lys Ala
180 185 190

Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Lys
195 200 205

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Val
210 215 220

Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
225 230 235

<210> 104
<211> 767
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> G28-1 VHVL (ADN)

<400> 104
accggtgagg tccagctgca acagtctgga cctgaactgg tgaagcctgg agcttcaatg 60

aagatttcct gcaaggcctc tggttactca ttcactggct acatcgtgaa ctggctgaag 120

cagagccatg gaaagaacct tgagtggatt ggacttatta atccatacaa aggtcttact 180

acctacaacc agaaattcaa gggcaaggcc acattaactg tagacaagtc atccagcaca 240

gcctacatgg agctcctcag tctgacatct gaagactctg cagtctatta ctgtgcaaga 300

tctgggtact atggtgactc ggactggtac ttcgatgtct ggggcgcagg gaccacggtc 360

accgtctcct ctggtggcgg tggctcgggc ggtggtggat ctggaggagg tgggagcggg 420

ggaggtggca gtgctagcga catccagatg acacagacta catcctccct gtctgcctct 480

ctgggagaca gagtcaccat cagttgcagg gcaagtcagg acattcgcaa ttatttaaac 540

tggtatcagc agaaaccaga tggaactgtt aaactcctga tctactacac atcaagatta 600

cactcaggag tcccatcaag gttcagtggc agtgggtctg gaacagatta ttctctcacc 660

attgccaacc tgcaaccaga agatattgcc acttactttt gccaacaggg taatacgctt 720

ccgtggacgt tcggtggagg caccaaactg gtaaccaaac gctcgag 767

<210> 105
<211> 253
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> G28-1 VHVL (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(121)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (122)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(253)
<223> VL

<400> 105

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Ile Val Asn Trp Leu Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Leu Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser
130 135 140

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
145 150 155 160

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
165 170 175

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
180 185 190

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
195 200 205

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gln Pro
210 215 220

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Val Thr Lys Arg Ser
245 250

<210> 106
<211> 749
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> G19-4 VLVH (ADN)

<400> 106
accggtgaca tccagatgac acagactaca tcctccctgt ctgcctctct gggagacaga 60

gtcaccatca gttgcagggc aagtcaggac attcgcaatt atttaaactg gtatcagcag 120

aaaccagatg gaactgttaa actcctgatc tactacacat caagattaca ctcaggagtc 180

ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctgga acagattatt ctctcaccat tgccaacctg 240

caaccagaag atattgccac ttacttttgc caacagggta atacgcttcc gtggacgttc 300

ggtggaggca ccaaactggt aaccaaacgg ggtggcggtg gctcgggcgg tggtggatct 360

ggaggaggtg ggagcgctag cgaggtccag ctgcaacagt ctggacctga actggtgaag 420

cctggagctt caatgaagat ttcctgcaag gcctctggtt actcattcac tggctacatc 480

gtgaactggc tgaagcagag ccatggaaag aaccttgagt ggattggact tattaatcca 540

tacaaaggtc ttactaccta caaccagaaa ttcaagggca aggccacatt aactgtagac 600

aagtcatcca gcacagccta catggagctc ctcagtctga catctgaaga ctctgcagtc 660

tattactgtg caagatctgg gtactatggt gactcggact ggtacttcga tgtctggggc 720

gcagggacca cggtcaccgt ctcctcgag 749

<210> 107
<211> 247
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> G-19-4 VLVH (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(108)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (109)..(125)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (126)..(247)
<223> VH

<400> 107

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Val Thr Lys Arg Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Glu Val Gln
115 120 125

Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys
130 135 140

Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Ile Val Asn
145 150 155 160

Trp Leu Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile
165 170 175

Asn Pro Tyr Lys Gly Leu Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys
180 185 190

Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
195 200 205

Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser
210 215 220

Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
225 230 235 240

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 108
<211> 752
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> G19-4 VHVL (ADN)

<400> 108
accggtgagg tccagctgca acagtctgga cctgaactgg tgaagcctgg agcttcaatg 60

aagatttcct gcaaggcctc tggttactca ttcactggct acatcgtgaa ctggctgaag 120

cagagccatg gaaagaacct tgagtggatt ggacttatta atccatacaa aggtcttact 180

acctacaacc agaaattcaa gggcaaggcc acattaactg tagacaagtc atccagcaca 240

gcctacatgg agctcctcag tctgacatct gaagactctg cagtctatta ctgtgcaaga 300

tctgggtact atggtgactc ggactggtac ttcgatgtct ggggcgcagg gaccacggtc 360

accgtctcct ctggtggcgg tggctcgggc ggtggtggat ctggaggagg tgggagcgct 420

agcgacatcc agatgacaca gactacatcc tccctgtctg cctctctggg agacagagtc 480

accatcagtt gcagggcaag tcaggacatt cgcaattatt taaactggta tcagcagaaa 540

ccagatggaa ctgttaaact cctgatctac tacacatcaa gattacactc aggagtccca 600

tcaaggttca gtggcagtgg gtctggaaca gattattctc tcaccattgc caacctgcaa 660

ccagaagata ttgccactta ctttttgccaa cagggtaata cgcttccgtg gacgttcggt 720

ggaggcacca aactggtaac caaacgctcg ag 752

<210> 109
<211> 248
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> G19-4 VHVL (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(122)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (123)..(139)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (140)..(248)
<223> VL

<400> 109

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Ile Val Asn Trp Leu Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Leu Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Asp Ile Gln Met Thr
130 135 140

Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile
145 150 155 160

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
165 170 175

Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg
180 185 190

Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
195 200 205

Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr
210 215 220

Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240

Thr Lys Leu Val Thr Lys Arg Ser
245

<210> 110
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<221> misc_feature
<223> ssc(s)-hIgG1 (ADN)

<400> 110
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tctccaccgt gctca 45

<210> 111
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> misc_feature
<223> ssc(s)-hIgG1 (AA)

<400> 111

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Ser
1 5 10 15

<210> 112
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<221> misc_feature
<223> scc(s)-hIgG1 (ADN)

<400> 112
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tgtccaccgt gctca 45

<210> 113
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> misc_feature
<223> scc(s)-hIgG1 (AA)

<400> 113

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Ser
1 5 10 15

<210> 114
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<221> misc_feature
<223> css(s)-hIgG1 (ADN)

<400> 114
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tctccaccga gctca 45

<210> 115
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> misc_feature
<223> css(s)-hIgG1 (AA)

<400> 115

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15

<210> 116
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<221> misc_feature
<223> scs(s)-hIgG1 (ADN)

<400> 116
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgtccaccga gctca 45

<210> 117
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> misc_feature
<223> scs(s)-hIgG1 (AA)

<400> 117

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15

<210> 118
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<400> 118
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgtccaccgt gctca 45

<210> 119
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 119

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Ser
1 5 10 15

<210> 120
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<400> 120
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgtccaccgt gccca 45

<210> 121
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 121

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 122
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<400> 122
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tctccaccga gccca 45

<210> 123
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 123

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro
1 5 10 15

<210> 124
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<221> misc_feature
<223> csc(p)-hIgG1 (ADN)

<400> 124
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tctccaccgt gccca 45

<210> 125
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> misc_feature
<223> csc(p)-hIgG1 (AA)

<400> 125

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 126
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<221> misc_feature
<223> ssc(p)-hIgG1 (ADN)

<400> 126
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tctccaccgt gccca 45

<210> 127
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> misc_feature
<223> ssc(p)-hIgG1 (AA)

<400> 127

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 128
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<221> misc_feature
<223> scc(p)-hIgG1 (ADN)

<400> 128
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tgtccaccgt gccca 45

<210> 129
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> misc_feature
<223> scc(p)-hIgG1 (AA)

<400> 129

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 130
<211> 45

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<221> misc_feature
<223> css(p)-hIgG1 (ADN)

<400> 130
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tctccaccga gccca 45

<210> 131
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> misc_feature
<223> css(p)-hIgG1 (AA)

<400> 131

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro
1 5 10 15

<210> 132
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<221> misc_feature
<223> ssc(p)-hIgG1 (ADN)

<400> 132
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgtccaccga gccca 45

<210> 133
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>
<221> misc_feature
<223> ssc(p)-hIgG1 (ADN)

<400> 133

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro
1 5 10 15

<210> 134
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc_feature
<223> ssc(p) (ADN)

<220>
<223> Synthetic primer

<400> 134
agttgtccac cgtgccca 18

<210> 135
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 135

Ser Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 136
<211> 7
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<400> 136
tgatcag 7

<210> 137

<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 137

Asp Gln
1

<210> 138
<211> 7
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<400> 138
ctcgagt 7

<210> 139
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 139

Ser Ser
1

<210> 140
<211> 654
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> hIgG1 wild type

<400> 140
gcacctgaac tcctgggtgg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 60

ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 120

cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 180

ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 240

caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 300

cccatcgaga aaacaatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 360

ctgccccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa 420

ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 480

tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 540

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 600

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atga 654

<210> 141
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> hIgG1 wild type

<400> 141

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 142
<211> 654
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> hIgG1 (P238S)

<400> 142
gcacctgaac tcctgggtgg atcgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 60

ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 120

cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 180

ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 240

caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 300

cccatcgaga aaacaatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 360

ctgccccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa 420

ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 480

tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 540

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 600

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atga 654

<210> 143
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> hIgG1 (P238S)

<400> 143

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 144
<211> 654
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> hIgG1 (P331S)

<400> 144
gcacctgaac tcctgggtgg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 60

ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 120

cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 180

ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 240

caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 300

tccatcgaga aaacaatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 360

ctgccccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa 420

ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 480

tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 540

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 600

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atga 654

<210> 145
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> hIgG1 (P331S)

<400> 145

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 146
<211> 654
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> hIgG1 (P238S/P331S)

<400> 146
gcacctgaac tcctgggtgg atcgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 60

ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 120

cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 180

ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 240

caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 300

tccatcgaga aaacaatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 360

ctgccccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa 420

ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 480

tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 540
accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 600

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atga 654

<210> 147
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> hIgG1 (P238S/P331S)

<400> 147

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 148
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Synthetic primer

<220>
<223> STD1 (ADN)

<400> 148
aattatggtg gcggtggctc gggcggtggt ggatctggag gaggtgggag tgggaattct 60

<210> 149
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> STD1 (AA)

<400> 149

Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Asn Ser
20

<210> 150
<211> 114
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> STD2 (ADN)

<400> 150
aattatggtg gcggtggctc gggcggtggt ggatctggag gaggtgggag tgggaattat 60

ggtggcggtg gctcgggcgg tggtggatct ggaggaggtg ggagtgggaa ttct 114

<210> 151
<211> 38
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> STD2 (AA)

<400> 151

Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Asn Ser
35

<210> 152
<211> 6
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> Vinculador H1 (PN)

<400> 152
aattct 6

<210> 153
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H1 (AA)

<400> 153

Asn Ser
1

<210> 154
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> Vinculador H2 (PN)

<400> 154
ggtggcggtg gctcggggaa ttct 24

<210> 155
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> Vinculador H2 (AA)

<400> 155

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser
1 5

<210> 156
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> Vinculador H3 (PN)

<400> 156
aattatggtg gcggtggctc tgggaattct 30

<210> 157
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H3 (AA)

<400> 157

Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser
1 5 10

<210> 158
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> Vinculador H4 (PN)

<400> 158
ggtggcggtg gctcgggcgg tggtggatct gggaattct 39

<210> 159
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H4 (AA)

<400> 159

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser
1 5 10

<210> 160
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> Vinculador H5 (PN)

<400> 160
aattatggtg gcggtggctc gggcggtggt ggatctggga attct 45

<210> 161
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H5 (AA)

<400> 161

Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser
1 5 10 15

<210> 162
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> Vinculador H6 (PN)

<400> 162
ggtggcggtg gctcgggcgg tggtggatct gggggaggag gcagcgggaa ttct 54

<210> 163
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H6 (AA)

<400> 163

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Asn Ser

<210> 164
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> Vinculador H7 (PN)

<400> 164
gggtgtccac cttgtccgaa ttct 24

<210> 165
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H7 (AA)

<400> 165

Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser
1 5

<210> 166
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> Vinculador(G4S)3

<400> 166
ggtggcggtg gatccggcgg aggtgggtcg ggtggcggcg gatct 45

<210> 167
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador(G4S)3

<400> 167

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 168
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic primer

<220>
<223> Vinculador(G4S)4

<400> 168
ggtggcggtg gctcgggcgg tggtggatct ggaggaggtg ggagcggggg aggtggcagt 60

<210> 169
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador(G4S)4

<400> 169

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser

<210> 170
<211> 2337
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-STD1-2e12HL (ADN)

<400> 170
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60

gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120

ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180

taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgcccatc caacctggct 240

tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300

agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360

cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420

ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg 480

aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540

aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600

ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660

gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720

gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780

ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840

acatccccac cgagctcagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500

ccgggtaaga attatggtgg cggtggctcg ggcggtggtg gatctggagg aggtgggagt 1560

gggaattctc aggtgcagct gaaggagtca ggacctggcc tggtggcgcc ctcacagagc 1620

ctgtccatca catgcaccgt ctcagggttc tcattaaccg gctatggtgt aaactgggtt 1680

cgccagcctc caggaaaggg tctggagtgg ctgggaatga tatggggtga tggaagcaca 1740

gactataatt cagctctcaa atccagacta tcgatcacca aggacaactc caagagccaa 1800

gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaact gatgacacag ccagatacta ctgtgctcga 1860

gatggttata gtaactttca ttactatgtt atggactact ggggtcaagg aacctcagtc 1920

accgtctcct ctgggggtgg aggctctggt ggcggtggat ccggcggagg tgggtcgggt 1980

ggcggcggat ctgacattgt gctcacccaa tctccagctt ctttggctgt gtctctaggt 2040

cagagagcca ccatctcctg cagagccagt gaaagtgttg aatattatgt cacaagttta 2100

atgcagtggt accaacagaa accaggacag ccacccaaac tcctcatctc tgctgctagc 2160

aacgtagaat ctggggtccc tgccaggttt agtggcagtg ggtctgggac agactttagc 2220

ctcaacatcc atcctgtgga ggaggatgat attgcaatgt atttctgtca gcaaagtagg 2280

aaggttccat ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa tcaaacgtta atctaga 2337

<210> 171
<211> 772
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-STD1-2e12HL (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(128)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)..(144)

<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(265)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(281)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (500)..(519)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (520)..(640)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (641)..(660)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (661)..(772)
<223> VL2

<400> 171

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
500 505 510

Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro
515 520 525

Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser
530 535 540

Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro
545 550 555 560

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr
565 570 575

Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn
580 585 590

Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp
595 600 605

Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr
610 615 620

Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
625 630 635 640

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
645 650 655

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
660 665 670

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
675 680 685

Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
690 695 700

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser
705 710 715 720

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
725 730 735

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys
740 745 750

Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
755 760 765

Glu Ile Lys Arg
770

<210> 172
<211> 772
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1(P238S/P331S)-STD1-2e12HL (w/2e12 Lider) (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(128)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(265)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(282)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (500)..(519)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature

<222> (520)..(640)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (641)..(660)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (661)..(772)
<223> VL2

<400> 172

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
500 505 510

Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro
515 520 525

Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser
530 535 540

Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro
545 550 555 560

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr
565 570 575

Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn
580 585 590

Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp

595 600 605

Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr
610 615 620

Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
625 630 635 640

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
645 650 655

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
660 665 670

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
675 680 685

Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
690 695 700

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser
705 710 715 720

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
725 730 735

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys
740 745 750

Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
755 760 765

Glu Ile Lys Arg
770

<210> 173
<211> 2322
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-STD1-2e12LH (ADN)

<400> 173
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60

gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120

ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180

taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240

tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300

agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360

cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420

ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg 480

aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540

aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600

ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660

gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720

gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780

ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840

acatccccac cgagccccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500

ccgggtaaga attatggtgg cggtggctcg ggcggtggtg gatctggagg aggtgggagt 1560

gggaattctg acattgtgct cacccaatct ccagcttctt tggctgtgtc tctaggtcag 1620

agagccacca tctcctgcag agccagtgaa agtgttgaat attatgtcac aagtttaatg 1680

cagtggtacc aacagaaacc aggacagcca cccaaactcc tcatctctgc tgctagcaac 1740

gtagaatctg gggtccctgc caggtttagt ggcagtgggt ctgggacaga ctttagcctc 1800

aacatccatc ctgtggagga ggatgatatt gcaatgtatt tctgtcagca aagtaggaag 1860

gttccatgga cgttcggtgg aggcaccaag ctggaaatca aacggggtgg cggtggatcc 1920

ggcggaggtg ggtcgggtgg cggcggatct caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc 1980

ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc acatgcaccg tctcagggtt ctcattaacc 2040

ggctatggtg taaactgggt tcgccagcct ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg 2100

atatgtgggtg atggaagcac agactataat tcagctctca aatccagact atcgatcacc 2160

aaggacaact ccaagagcca agttttctta aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca 2220

gccagatact actgtgctcg agatggttat agtaactttc attactatgt tatggactac 2280

tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tcttaatcta ga 2322

<210> 174
<211> 767
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-STD1-2e12LH (w/2e12 Líder) (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(128)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(265)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(282)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (500)..(519)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (520)..(631)
<223> VL2

<220>
<221> misc_feature
<222> (632)..(646)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (647)..(767)
<223> VH2

<400> 174

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
500 505 510

Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
515 520 525

Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala
530 535 540

Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln
545 550 555 560

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn
565 570 575

Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
580 585 590

Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met
595 600 605

Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly
610 615 620

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
625 630 635 640

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly
645 650 655

Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly
660 665 670

Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly
675 680 685

Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp
690 695 700

Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser
705 710 715 720

Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr
725 730 735

Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr
740 745 750

Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
755 760 765

<210> 175
<211> 767
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1(P238S/P331S)-STD1-2e12LH (w/2e12 Líder) (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(128)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(265)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(282)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (500)..(519)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (520)..(631)
<223> VL2

<220>

<221> misc_feature
<222> (632)..(646)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (647)..(767)
<223> VH2

<400> 175

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
500 505 510

Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
515 520 525

Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala
530 535 540

Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln
545 550 555 560

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn
565 570 575

Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
580 585 590

Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met
595 600 605

Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly

610 615 620

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
625 630 635 640

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly
645 650 655

Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly
660 665 670

Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly
675 680 685

Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp
690 695 700

Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser
705 710 715 720

Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr
725 730 735

Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr
740 745 750

Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
755 760 765

<210> 176
<211> 2376
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-STD2-2e12LH (ADN)

<400> 176
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60

gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120

ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180

taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240

tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300

agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360

cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420

ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg 480

aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540

aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600

ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660

gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720

gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780

ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840

acatccccac cgagccccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500

ccgggtaaga attatggtgg cggtggctcg ggcggtggtg gatctggagg aggtgggagt 1560

gggaattatg gtggcggtgg ctcgggcggt ggtggatctg gaggaggtgg gagtgggaat 1620

tctgacattg tgctcaccca atctccagct tctttggctg tgtctctagg tcagagagcc 1680

accatctcct gcagagccag tgaaagtgtt gaatattatg tcacaagttt aatgcagtgg 1740

taccaacaga aaccaggaca gccacccaaa ctcctcatct ctgctgctag caacgtagaa 1800

tctggggtcc ctgccaggtt tagtggcagt gggtctggga cagactttag cctcaacatc 1860

catcctgtgg aggaggatga tattgcaatg tatttctgtc agcaaagtag gaaggttcca 1920

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacggg gtggcggtgg atccggcgga 1980

ggtgggtcgg gtggcggcgg atctcaggtg cagctgaagg agtcaggacc tggcctggtg 2040

gcgccctcac agagcctgtc catcacatgc accgtctcag ggttctcatt aaccggctat 2100

ggtgtaaact gggttcgcca gcctccagga aagggtctgg agtggctggg aatgatatgg 2160

ggtgatggaa gcacagacta taattcagct ctcaaatcca gactatcgat caccaaggac 2220

aactccaaga gccaagtttt cttaaaaatg aacagtctgc aaactgatga cacagccaga 2280

tactactgtg ctcgagatgg ttatagtaac tttcattact atgttatgga ctactggggt 2340

caaggaacct cagtcaccgt ctcctcttaa tctaga 2376

<210> 177
<211> 785
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-STD2-2e12LH (w/2e12 Líder)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(129)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (130)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(265)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(282)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (500)..(537)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (538)..(649)
<223> VL2

<220>
<221> misc_feature
<222> (650)..(664)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (665)..(785)
<223> VH2

<400> 177

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
500 505 510

Gly Gly Gly Ser Gly Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
515 520 525

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser
530 535 540

Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
545 550 555 560

Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp
565 570 575

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala
580 585 590

Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
595 600 605

Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile
610 615 620

Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly
625 630 635 640

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
645 650 655

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly
660 665 670

Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val
675 680 685

Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro
690 695 700

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser
705 710 715 720

Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp
725 730 735

Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp
740 745 750

Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His
755 760 765

Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
770 775 780

Ser
785

<210> 178
<211> 785
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1(P238S/P331S)-STD2-2e12LH (w/2e12 Líder) (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(128)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(265)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(281)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (500)..(537)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (538)..(649)
<223> VL2

<220>

<221> misc_feature
<222> (650)..(664)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (665)..(785)
<223> VH2

<400> 178

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
500 505 510

Gly Gly Gly Ser Gly Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
515 520 525

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser
530 535 540

Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
545 550 555 560

Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp
565 570 575

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala
580 585 590

Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
595 600 605

Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile

610 615 620

Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly
625 630 635 640

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
645 650 655

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly
660 665 670

Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val
675 680 685

Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro
690 695 700

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser
705 710 715 720

Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp
725 730 735

Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp
740 745 750

Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His
755 760 765

Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
770 775 780

Ser
785

<210> 179
<211> 2391
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> 2H7sslgG1-STD2-2e12HL (ADN)

<400> 179
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60

gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120

ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180

taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgcccatc caacctggct 240

tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300

agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360

cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420

ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg 480

aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540

aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600

ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660

gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720

gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780

ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840

acatccccac cgagcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500

ccgggtaaga attatggtgg cggtggctcg ggcggtggtg gatctggagg aggtgggagt 1560

gggaattatg gtggcggtgg ctcgggcggt ggtggatctg gaggaggtgg gagtgggaat 1620

tctcaggtgc agctgaagga gtcaggacct ggcctggtgg cgccctcaca gagcctgtcc 1680

atcacatgca ccgtctcagg gttctcatta accggctatg gtgtaaactg ggttcgccag 1740

cctccaggaa agggtctgga gtggctggga atgatatggg gtgatggaag cacagactat 1800

aattcagctc tcaaatccag actatcgatc accaaggaca actccaagag ccaagttttc 1860

ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac acagccagat actactgtgc tcgagatggt 1920

tatagtaact ttcattacta tgttatggac tactggggtc aaggaaccctc agtcaccgtc 1980

tcctctgggg gtggaggctc tggtggcggt ggatccggcg gaggtgggtc gggtggcggc 2040

ggatctgaca ttgtgctcac ccaatctcca gcttctttgg ctgtgtctct aggtcagaga 2100

gccaccatct cctgcagagc cagtgaaagt gttgaatatt atgtcacaag tttaatgcag 2160

tggtaccaac agaaaccagg acagccaccc aaactcctca tctctgctgc tagcaacgta 2220

gaatctgggg tccctgccag gtttagtggc agtgggtctg ggacagactt tagcctcaac 2280

atccatcctg tggaggagga tgatattgca atgtatttct gtcagcaaag taggaaggtt 2340

ccatggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaac gttaatctag a 2391

<210> 180
<211> 790
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-STD2-2e12HL (w/2e12 Líder) (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(128)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature

<222> (129)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(265)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(282)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (500)..(537)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (538)..(658)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (659)..(678)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (679)..(790)
<223> VL2

<400> 180
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
500 505 510

Gly Gly Gly Ser Gly Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
515 520 525

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser
530 535 540

Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr
545 550 555 560

Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln
565 570 575

Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly
580 585 590

Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys
595 600 605

Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr
610 615 620

Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe
625 630 635 640

His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
645 650 655

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
660 665 670

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
675 680 685

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
690 695 700

Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln
705 710 715 720

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val
725 730 735

Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
740 745 750

Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr
755 760 765

Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr
770 775 780

Lys Leu Glu Ile Lys Arg
785 790

<210> 181
<211> 790
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1(P238S/P331S)-STD2-2e12HL (w/2e12 Líder) (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(128)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(265)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(282)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (500)..(537)

<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (538)..(658)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (659)..(678)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (679)..(790)
<223> VL2

<400> 181

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
500 505 510

Gly Gly Gly Ser Gly Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
515 520 525

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser
530 535 540

Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr
545 550 555 560

Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln
565 570 575

Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly

580 585 590

Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys
595 600 605

Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr
610 615 620

Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe
625 630 635 640

His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
645 650 655

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
660 665 670

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
675 680 685

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
690 695 700

Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln
705 710 715 720

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val
725 730 735

Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
740 745 750

Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr
755 760 765

Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr
770 775 780

Lys Leu Glu Ile Lys Arg
785 790

<210> 182
<211> 2283
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-H1-2e12HL (ADN)

<400> 182
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60

gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120

ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180

taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240

tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300

agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360

cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420

ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg 480

aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540

aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600

ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660

gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720

gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780

ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840

acatccccac cgagcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500

ccgggtaaga attctcaggt gcagctgaag gagtcaggac ctggcctggt ggcgccctca 1560

cagagcctgt ccatcacatg caccgtctca gggttctcat taaccggcta tggtgtaaac 1620

tgggttcgcc agcctccagg aaagggtctg gagtggctgg gaatgatatg gggtgatgga 1680

agcacagact ataattcagc tctcaaatcc agactatcga tcaccaagga caactccaag 1740

agccaagttt tcttaaaaat gaacagtctg caaactgatg acacagccag atactactgt 1800

gctcgagatg gttatagtaa ctttcattac tatgttatgg actactgggg tcaaggaacc 1860

tcagtcaccg tctcctctgg gggtggaggc tctggtggcg gtggatccgg cggaggtggg 1920

tcgggtggcg gcggatctga cattgtgctc acccaatctc cagcttcttt ggctgtgtct 1980

ctaggtcaga gagccaccat ctcctgcaga gccagtgaaa gtgttgaata ttatgtcaca 2040

agtttaatgc agtggtacca acagaaacca ggacagccac ccaaactcct catctctgct 2100

gctagcaacg tagaatctgg ggtccctgcc aggtttagtg gcagtgggtc tgggacagac 2160

tttagcctca acatccatcc tgtggaggag gatgatattg caatgtattt ctgtcagcaa 2220

agtaggaagg ttccatggac gttcggtgga ggcaccaagc tggaaatcaa acgttaatct 2280

aga 2283

<210> 183
<211> 754
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-H1-2e12HL (w/2e12 Líder) (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>

<221> misc_feature
<222> (23)..(128)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(265)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(281)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (500)..(501)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (502)..(622)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (623)..(642)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (643)..(754)
<223> VL2

<400> 183

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser

50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu
500 505 510

Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe
515 520 525

Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys
530 535 540

Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr
545 550 555 560

Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys
565 570 575

Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala
580 585 590

Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr Val
595 600 605

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
610 615 620

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
625 630 635 640

Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser
645 650 655

Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu
660 665 670

Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
675 680 685

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val
690 695 700

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn
705 710 715 720

Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln
725 730 735

Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
740 745 750

Lys Arg

<210> 184
<211> 2301
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-H2-2e12HL (ADN)

<400> 184
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60

gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120

ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180

taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgcccatc caacctggct 240

tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300

agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360

cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420

ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg 480

aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540

aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600

ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660

gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720

gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780

ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840

acatccccac cgagcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500

ccgggtaagg gtggcggtgg ctcggggaat tctcaggtgc agctgaagga gtcaggacct 1560

ggcctggtgg cgccctcaca gagcctgtcc atcacatgca ccgtctcagg gttctcatta 1620

accggctatg gtgtaaactg ggttcgccag cctccaggaa agggtctgga gtggctggga 1680

atgatatggg gtgatggaag cacagactat aattcagctc tcaaatccag actatcgatc 1740

accaaggaca actccaagag ccaagttttc ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac 1800

acagccagat actactgtgc tcgagatggt tatagtaact ttcattacta tgttatggac 1860

tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctctgggg gtggaggctc tggtggcggt 1920

ggatccggcg gaggtgggtc gggtggcggc ggatctgaca ttgtgctcac ccaatctcca 1980

gcttctttgg ctgtgtctct aggtcagaga gccaccatct cctgcagagc cagtgaaagt 2040

gttgaatatt atgtcacaag tttaatgcag tggtaccaac agaaaccagg acagccaccc 2100

aaactcctca tctctgctgc tagcaacgta gaatctgggg tccctgccag gtttagtggc 2160

agtgggtctg ggacagactt tagcctcaac atccatcctg tggaggagga tgatattgca 2220

atgtatttct gtcagcaaag taggaaggtt ccatggacgt tcggtggagg caccaagctg 2280

gaaatcaaac gttaatctag a 2301

<210> 185
<211> 760
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-H2-2e12HL (w/2e12 Líder) (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(127)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (128)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(265)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(282)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (500)..(507)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (508)..(628)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (629)..(648)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (649)..(760)
<223> VL2

<400> 185

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys
500 505 510

Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr
515 520 525

Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val
530 535 540

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly
545 550 555 560

Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile
565 570 575

Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu
580 585 590

Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser
595 600 605

Asn Phe His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
610 615 620

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
625 630 635 640

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
645 650 655

Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg
660 665 670

Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr
675 680 685

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser
690 695 700

Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
705 710 715 720

Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala
725 730 735

Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly
740 745 750

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
755 760

<210> 186
<211> 2307
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-H3-2e12HL (ADN)

<400> 186
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60

gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120
ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180

taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgcccatc caacctggct 240

tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300

agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360

cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420

ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg 480

aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540

aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600

ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660

gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720

gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780

ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840

acatccccac cgagccccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500

ccgggtaaga attatggtgg cggtggctct gggaattctc aggtgcagct gaaggagtca 1560

ggacctggcc tggtggcgcc ctcacagagc ctgtccatca catgcaccgt ctcagggttc 1620

tcattaaccg gctatggtgt aaactgggtt cgccagcctc caggaaaggg tctggagtgg 1680

ctgggaatga tatggggtga tggaagcaca gactataatt cagctctcaa atccagacta 1740

tcgatcacca aggacaactc caagagccaa gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaact 1800

gatgacacag ccagatacta ctgtgctcga gatggttata gtaactttca ttactatgtt 1860

atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct ctgggggtgg aggctctggt 1920

ggcggtggat ccggcggagg tgggtcgggt ggcggcggat ctgacattgt gctcacccaa 1980

tctccagctt ctttggctgt gtctctaggt cagagagcca ccatctcctg cagagccagt 2040
gaaagtgttg aatattatgt cacaagttta atgcagtggt accaacagaa accaggacag 2100

ccacccaaac tcctcatctc tgctgctagc aacgtagaat ctggggtccc tgccaggttt 2160

agtggcagtg ggtctgggac agactttagc ctcaacatcc atcctgtgga ggaggatgat 2220

attgcaatgt atttctgtca gcaaagtagg aaggttccat ggacgttcgg tggaggcacc 2280

aagctggaaa tcaaacgtta atctaga 2307

<210> 187
<211> 762
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-H3-2e12HL (w/2e12 Líder) (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(128)
<223> VL
<220>
<221> misc_feature
<222> (129)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(265)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(282)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (500)..(509)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (510)..(630)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (631)..(650)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (651)..(762)
<223> VL2

<400> 187

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln
500 505 510

Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser
515 520 525

Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn
530 535 540

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile
545 550 555 560

Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu
565 570 575

Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn
580 585 590

Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly
595 600 605

Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
610 615 620

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
625 630 635 640

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln
645 650 655

Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser
660 665 670

Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln
675 680 685

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala
690 695 700

Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
705 710 715 720

Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp
725 730 735

Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe
740 745 750

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
755 760

<210> 188
<211> 2316
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-H4-2e12HL (ADN)

<400> 188
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60

gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120

ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180

taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240

tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300

agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360

cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420

ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg 480

aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540

aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600

ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660

gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720

gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780

ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840
acatccccac cgagccccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200

gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500

ccgggtaagg gtggcggtgg ctcgggcggt ggtggatctg ggaattctca ggtgcagctg 1560

aaggagtcag gacctggcct ggtggcgccc tcacagagcc tgtccatcac atgcaccgtc 1620

tcagggttct cattaaccgg ctatggtgta aactgggttc gccagcctcc aggaaagggt 1680

ctggagtggc tgggaatgat atggggtgat ggaagcacag actataattc agctctcaaa 1740

tccagactat cgatcaccaa ggacaactcc aagagccaag ttttcttaaa aatgaacagt 1800

ctgcaaactg atgacacagc cagatactac tgtgctcgag atggttatag taactttcat 1860

tactatgtta tggactactg gggtcaagga acctcagtca ccgtctcctc tgggggtgga 1920

ggctctggtg gcggtggatc cggcggaggt gggtcgggtg gcggcggatc tgacattgtg 1980

ctcacccaat ctccagcttc tttggctgtg tctctaggtc agagagccac catctcctgc 2040

agagccagtg aaagtgttga tattatgtc acaagtttaa tgcagtggta ccaacagaaa 2100

ccaggacagc cacccaaact cctcatctct gctgctagca acgtagaatc tggggtccct 2160

gccaggttta gtggcagtgg gtctgggaca gactttagcc tcaacatcca tcctgtggag 2220

gaggatgata ttgcaatgta tttctgtcag caaagtagga aggttccatg gacgttcggt 2280

ggaggcacca agctggaaat caaacgttaa tctaga 2316

<210> 189
<211> 765
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-H4-2e12HL (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(128)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(265)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature

<222> (268)..(282)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (500)..(512)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (513)..(633)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (634)..(653)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (654)..(765)
<223> VL2

<400> 189
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser
500 505 510

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
515 520 525

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
530 535 540

Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
545 550 555 560

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
565 570 575

Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
580 585 590

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
595 600 605

Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly
610 615 620

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
625 630 635 640

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
645 650 655

Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala
660 665 670

Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser
675 680 685

Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
690 695 700

Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
705 710 715 720

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu
725 730 735

Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro
740 745 750

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
755 760 765

<210> 190
<211> 2322
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-H5-2e12HL (ADN)

<400> 190
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60

gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120

ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180

taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240

tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300

agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360

cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420

ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg 480

aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540

aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600

ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660

gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720

gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780

ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840

acatccccac cgagcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500

ccgggtaaga attatggtgg cggtggctcg ggcggtggtg gatctgggaa ttctcaggtg 1560
cagctgaagg agtcaggacc tggcctggtg gcgccctcac agagcctgtc catcacatgc 1620

accgtctcag ggttctcatt aaccggctat ggtgtaaact gggttcgcca gcctccagga 1680

aagggtctgg agtggctggg aatgatatgg ggtgatggaa gcacagacta taattcagct 1740

ctcaaatcca gactatcgat caccaaggac aactccaaga gccaagtttt cttaaaaatg 1800

aacagtctgc aaactgatga cacagccaga tactactgtg ctcgagatgg ttatagtaac 1860

tttcattact atgttatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctctggg 1920

ggtggaggct ctggtggcgg tggatccggc ggaggtgggt cgggtggcgg cggatctgac 1980

attgtgctca cccaatctcc agcttctttg gctgtgtctc taggtcagag agccaccatc 2040

tcctgcagag ccagtgaaag tgttgaatat tatgtcacaa gtttaatgca gtggtaccaa 2100

cagaaaccag gacagccacc caaactcctc atctctgctg ctagcaacgt agaatctggg 2160

gtccctgcca ggtttagtgg cagtgggtct gggacagact ttagcctcaa catccatcct 2220

gtggaggagg atgatattgc aatgtatttc tgtcagcaaa gtaggaaggt tccatggacg 2280

ttcggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa cgttaatcta ga 2322

<210> 191
<211> 767
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-H5-2e12HL (w/2e12 Líder) (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(128)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(265)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(282)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (500)..(514)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (515)..(635)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (636)..(655)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (656)..(767)
<223> VL2

<400> 191

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
500 505 510

Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro
515 520 525

Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
530 535 540

Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
545 550 555 560

Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala
565 570 575

Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val
580 585 590

Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr
595 600 605

Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr
610 615 620

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
625 630 635 640

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
645 650 655

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln
660 665 670

Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val
675 680 685

Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
690 695 700

Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg
705 710 715 720

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro
725 730 735

Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys
740 745 750

Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
755 760 765

<210> 192
<211> 2331
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-H6-2e12HL (ADN)

<400> 192
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60

gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120

ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180

taccagcaga agccaggatc ctccccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240

tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300

agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360

cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420

ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg 480

aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540

aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600

ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660

gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720

gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780

ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840

acatccccac cgagcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200

gaaccacagg tgtacaccct gccccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500

ccgggtaagg gtggcggtgg ctcgggcggt ggtggatctg ggggaggagg cagcgggaat 1560

tctcaggtgc agctgaagga gtcaggacct ggcctggtgg cgccctcaca gagcctgtcc 1620

atcacatgca ccgtctcagg gttctcatta accggctatg gtgtaaactg ggttcgccag 1680

cctccaggaa agggtctgga gtggctggga atgatatggg gtgatggaag cacagactat 1740

aattcagctc tcaaatccag actatcgatc accaaggaca actccaagag ccaagttttc 1800

ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac acagccagat actactgtgc tcgagatggt 1860

tatagtaact ttcattacta tgttatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 1920

tcctctgggg gtggaggctc tggtggcggt ggatccggcg gaggtgggtc gggtggcggc 1980

ggatctgaca ttgtgctcac ccaatctcca gcttctttgg ctgtgtctct aggtcagaga 2040

gccaccatct cctgcagagc cagtgaaagt gttgaatatt atgtcacaag tttaatgcag 2100

tggtaccaac agaaaccagg acagccaccc aaactcctca tctctgctgc tagcaacgta 2160

gaatctgggg tccctgccag gtttagtggc agtgggtctg ggacagactt tagcctcaac 2220

atccatcctg tggaggagga tgatattgca atgtatttct gtcagcaaag taggaaggtt 2280

ccatggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaac gttaatctag a 2331

<210> 193
<211> 770
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-H6-2e12HL (w/2e12 Líder) (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(128)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(265)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(282)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (500)..(517)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (518)..(638)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (639)..(658)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (659)..(770)
<223> VL2

<400> 193

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
500 505 510

Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu
515 520 525

Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe
530 535 540

Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys
545 550 555 560

Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr
565 570 575

Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys
580 585 590

Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala
595 600 605

Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr Val
610 615 620

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
625 630 635 640

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
645 650 655

Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser
660 665 670

Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu
675 680 685

Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
690 695 700

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val
705 710 715 720

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn
725 730 735

Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln
740 745 750

Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
755 760 765

Lys Arg
770

<210> 194
<211> 2301
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> 2H7sscIgG1-H7-2e12HL (ADN)

<400> 194
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60

gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120

ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180

taccagcaga agccaggatc ctccccaaa ccctggattt atgcccatc caacctggct 240

tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300

agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360

cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420

ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg 480

aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540

aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600

ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660

gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720

gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780

ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840

acatccccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggat cgtcagtctt cctcttcccc 900

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatcca agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500

ccgggtaagg ggtgtccacc ttgtccgaat tctcaggtgc agctgaagga gtcagggcct 1560

ggcagcgtgg cgccctcaca gagcctgtcc atcacatgca ccgtctcagg gttctcatta 1620

accggctatg gtgtaaactg ggttcgccag cctccaggaa agggtctgga gtggctggga 1680

atgatatggg gtgatggaag cacagactat aattcagctc tcaaatccag actatcgatc 1740

accaaggaca actccaagag ccaagttttc ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac 1800

acagccagat actactgtgc tcgagatggt tatagtaact ttcattacta tgttatggac 1860

tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctctgggg gtggaggctc tggtggcggt 1920

ggatccggcg gaggtgggtc gggtggcggc ggatctgaca ttgtgctcac ccaatctcca 1980

gcttctttgg ctgtgtctct aggtcagaga gccaccatct cctgcagagc cagtgaaagt 2040

gttgaatatt atgtcacaag tttaatgcag tggtaccaac agaaaccagg acagccaccc 2100

aagctcctca tctctgctgc tagcaacgta gaatctgggg tccctgccag gtttagtggc 2160

agtgggtctg ggacagactt tagcctcaac atccatcctg tggaggagga tgatattgca 2220

atgtatttct gtcagcaaag taggaaggtt ccatggacgt tcggtggagg caccaagctg 2280

gaaatcaaac gttaatctag a 2301

<210> 195
<211> 760
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2H7sscIgG1-H7-2e12HL (w/2e12 Vinculador) (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(128)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(265)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(282)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (500)..(507)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature

<222> (508)..(628)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (629)..(648)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (649)..(760)
<223> VL2

<400> 195

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys
500 505 510

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr
515 520 525

Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val
530 535 540

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly
545 550 555 560

Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile
565 570 575

Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu
580 585 590

Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser

595 600 605

Asn Phe His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
610 615 620

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
625 630 635 640

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
645 650 655

Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg
660 665 670

Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr
675 680 685

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser
690 695 700

Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
705 710 715 720

Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala
725 730 735

Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly
740 745 750

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
755 760

<210> 196
<211> 2283
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-H7-G194 HL (ADN)

<400> 196
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60

gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120

ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180

taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240

tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300

agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360

cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420

ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg 480

aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540

aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600

ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660

gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720

gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780

ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840

acatccccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggat cgtcagtctt cctcttcccc 900

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatcca agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500

ccgggtaagg ggtgtccacc ttgtccgaat tctgaggtcc agctgcaaca gtctggacct 1560

gaactggtga agcctggagc ttcaatgaag atttcctgca aggcctctgg ttactcattc 1620

actggctaca tcgtgaactg gctgaagcag agccatggaa agaaccttga gtggattgga 1680

cttattaatc catacaaagg tcttactacc tacaaccaga aattcaaggg caaggccaca 1740

ttaactgtag acaagtcatc cagcacagcc tacatggagc tcctcagtct gacatctgaa 1800

gactctgcag tctattactg tgcaagatct gggtactatg gtgactcgga ctggtacttc 1860

gatgtctggg gcgcagggac cacggtcacc gtctcctctg gtggcggtgg ctcgggcggt 1920

ggtggatctg gaggaggtgg gagcgctagc gacatccaga tgacacagac tacatcctcc 1980

ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc atcagttgca gggcaagtca ggacattcgc 2040

aattatttaa actggtatca gcagaaacca gatggaactg ttaaactcct gatctactac 2100

acatcaagat tacactcagg agtcccatca aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat 2160

tattctctca ccattgccaa cctgcaacca gaagatattg ccacttactt ttgccaacag 2220

ggtaatacgc ttccgtggac gttcggtgga ggcaccaaac tggtaaccaa acggtaatct 2280

aga 2283

<210> 197
<211> 754
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-H7-G194 HL (w/2e12 Líder) (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(128)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature

<222> (145)..(265)
<223> VH1

<220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(282)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (500)..(507)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (508)..(629)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (630)..(646)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (647)..(754)
<223> VL2

<400> 197

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln
500 505 510

Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser
515 520 525

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Ile Val Asn Trp Leu

530 535 540

Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro
545 550 555 560

Tyr Lys Gly Leu Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr
565 570 575

Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser
580 585 590

Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr
595 600 605

Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
610 615 620

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
625 630 635 640

Gly Gly Gly Ser Ala Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
645 650 655

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
660 665 670

Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
675 680 685

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
690 695 700

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
705 710 715 720

Ile Ala Asn Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
725 730 735

Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Val Thr
740 745 750

Lys Arg

<210> 198
<211> 2298
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-H7-G281 HL (ADN)

<400> 198
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60

gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120

ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180

taccagcaga agccaggatc ctccccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240

tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300

agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360

cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420

ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg 480

aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540

aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600

ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660

gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720

gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780

ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840

acatccccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggat cgtcagtctt cctcttcccc 900

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200

gaaccacagg tgtacaccct gccccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatcca agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500

ccgggtaagg ggtgtccacc ttgtccgaat tctgaggtcc agctgcaaca gtctggacct 1560

gaactggtga agcctggagc ttcaatgaag atttcctgca aggcctctgg ttactcattc 1620

actggctaca tcgtgaactg gctgaagcag agccatggaa agaaccttga gtggattgga 1680

cttattaatc catacaaagg tcttactacc tacaaccaga aattcaaggg caaggccaca 1740

ttaactgtag acaagtcatc cagcacagcc tacatggagc tcctcagtct gacatctgaa 1800

gactctgcag tctattactg tgcaagatct gggtactatg gtgactcgga ctggtacttc 1860

gatgtctggg gcgcagggac cacggtcacc gtctcctctg gtggcggtgg ctcgggcggt 1920

ggtggatctg gaggaggtgg gagcgggggga ggtggcagtg ctagcgacat ccagatgaca 1980

cagactacat cctccctgtc tgcctctctg ggagacagag tcaccatcag ttgcagggca 2040

agtcaggaca ttcgcaatta tttaaactgg tatcagcaga aaccagatgg aactgttaaa 2100

ctcctgatct actacacatc aagattacac tcaggagtcc catcaaggtt cagtggcagt 2160

gggtctggaa cagattattc tctcaccatt gccaacctgc aaccagaaga tattgccact 2220

actttttgcc aacagggtaa tacgcttccg tggacgttcg gtggaggcac caaactggta 2280

accaaacggt aatctaga 2298

<210> 199
<211> 759
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-H7-G281 HL (w/2e12 Líder) (AA)

<220>

<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(128)
<223> VL1

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(265)
<223> VH1

<220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(282)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (500)..(507)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (508)..(629)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (630)..(651)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (652)..(759)
<223> VL2

<400> 199

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln
500 505 510

Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser
515 520 525

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Ile Val Asn Trp Leu
530 535 540

Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro
545 550 555 560

Tyr Lys Gly Leu Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr
565 570 575

Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser
580 585 590

Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr
595 600 605

Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
610 615 620

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
625 630 635 640

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Asp Ile Gln Met Thr
645 650 655

Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile
660 665 670

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
675 680 685

Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg
690 695 700

Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
705 710 715 720

Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr
725 730 735

Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly
740 745 750

Thr Lys Leu Val Thr Lys Arg
755

<210> 200
<211> 1533
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> 2e12-sss-IgG1 HL SMIP (ADN)

<400> 200
atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaatca gtgcttcagt cataatgtcc 60

agaggagtcc aggtgcagct gaaggagtca ggacctggcc tggtggcgcc ctcacagagc 120

ctgtccatca catgcaccgt ctcagggttc tcattaaccg gctatggtgt aaactgggtt 180

cgccagcctc caggaaaggg tctagagtgg ctgggaatga tatggggtga tggaagcaca 240

gactataatt cagctctcaa atccagacta tcgatcacca aggacaactc caagagccaa 300

gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaact gatgacacag ccagatacta ctgtgctcga 360

gatggttata gtaactttca ttactatgtt atggactact ggggtcaagg aacctcagtc 420

accgtctcct ctgggggtgg aggctctggt ggcggtggat ccggcggagg tgggtcgggt 480

ggcggcggat ctgacattgt gctcacccaa tctccagctt ctttggctgt gtctctaggt 540

cagagagcca ccatctcctg cagagccagt gaaagtgttg aatattatgt cacaagttta 600

atgcagtggt accaacagaa accaggacag ccacccaaac tcctcatctc tgctgctagc 660

aacgtagaat ctggggtccc tgccaggttt agtggcagtg ggtctgggac agactttagc 720

ctcaacatcc atcctgtgga ggaggatgat attgcaatgt atttctgtca gcaaagtagg 780

aaggttccat ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa tcaaacgtga tcaggagccc 840

aaatcttctg acaaaactca cacatcccca ccgtccccag cacctgaact cctgggggga 900

tcgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 960

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 1020

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 1080

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1140

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagcct ccatcgagaa aacaatctcc 1200

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 1260

ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1320

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1380

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1440

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1500

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 1533

<210> 201
<211> 510
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2e12-sss-IgG1 HL SMIP (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(144)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(164)

<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (165)..(276)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (279)..(293)
<223> Hinge

<400> 201

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Val Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro
20 25 30

Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser
35 40 45

Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro
50 55 60

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr
65 70 75 80

Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn
85 90 95

Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp
100 105 110

Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr
115 120 125

Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
145 150 155 160

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
165 170 175

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
180 185 190

Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
195 200 205

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser
210 215 220

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
225 230 235 240

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys
245 250 255

Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
260 265 270

Glu Ile Lys Arg Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr
275 280 285

Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe
290 295 300

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
305 310 315 320

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
325 330 335

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
340 345 350

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
355 360 365

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
370 375 380

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
385 390 395 400

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
405 410 415

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
420 425 430

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
435 440 445

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
450 455 460

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
465 470 475 480

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
485 490 495

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505 510

<210> 202
<211> 1518
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> 2e12-sss-IgG1 LH SMIP (ADN)

<400> 202
atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaatca gtgcttcagt cataatgtcc 60

agaggagtcg acattgtgct cacccaatct ccagcttctt tggctgtgtc tctaggtcag 120

agagccacca tctcctgcag agccagtgaa agtgttgaat attatgtcac aagtttaatg 180

cagtggtacc aacagaaacc aggacagcca cccaaactcc tcatctctgc tgctagcaac 240

gtagaatctg gggtccctgc caggtttagt ggcagtgggt ctgggacaga ctttagcctc 300

SAA

aacatccatc ctgtggagga ggatgatatt gcaatgtatt tctgtcagca aagtaggaag 360

gttccatgga cgttcggtgg aggcaccaag ctggaaatca aacggggtgg cggtggatcc 420

ggcggaggtg ggtcgggtgg cggcggatct caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc 480

ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc acatgcaccg tctcagggtt ctcattaacc 540

ggctatggtg taaactgggt tcgccagcct ccaggaaagg gtctagagtg gctgggaatg 600

atatggggtg atggaagcac agactataat tcagctctca aatccagact atcgatcacc 660

aaggacaact ccaagagcca agttttctta aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca 720

gccagatact actgtgctcg agatggttat agtaactttc attactatgt tatggactac 780

tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tctgatcagg agcccaaatc ttctgacaaa 840

actcacacat ccccaccgtc cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 900

ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga ccctgaggt cacatgcgtg 960

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 1020

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 1080

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 1140

gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacaa tctccaaagc caaagggcag 1200

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1260

gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1320

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1380

tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1440

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1500

ctgtctccgg gtaaatga 1518

<210> 203
<211> 505
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2e12-sss-IgG1 LH SMIP (AA)

SAS

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(23)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(135)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (136)..(150)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (151)..(271)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (274)..(288)
<223> Hinge

<400> 203

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Val Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
20 25 30

Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala
35 40 45

Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln
50 55 60

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn
65 70 75 80

Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
85 90 95

Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met
100 105 110

Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly
115 120 125

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly
145 150 155 160

Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly
165 170 175

Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly
180 185 190

Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp
195 200 205

Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser
210 215 220

Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr
225 230 235 240

Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr
245 250 255

Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp
260 265 270

Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro
275 280 285

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
290 295 300

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
305 310 315 320

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
325 330 335

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
340 345 350

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
355 360 365

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
370 375 380

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
385 390 395 400

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
405 410 415

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
420 425 430

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
435 440 445

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
450 455 460

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
465 470 475 480

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
485 490 495

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505

<210> 204
<211> 1498
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>

<223> G28-1 LH SMIP (ADN)

<400> 204
aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tcctgctact ctggctccca 60

gataccaccg gtgacatcca gatgactcag tctccagcct ccctatctgc atctgtggga 120

gagactgtca ccatcacatg tcgaacaagt gaaaatgttt acagttattt ggcttggtat 180

cagcagaaac agggaaaatc tcctcagctc ctggtctctt ttgcaaaaac cttagcagaa 240

ggtgtgccat caaggttcag tggcagtgga tcaggcacac agttttctct gaagatcagc 300

agcctgcagc ctgaagattc tggaagttat ttctgtcaac atcattccga taatccgtgg 360

acgttcggtg gaggcaccga actggagatc aaaggtggcg gtggctcggg cggtggtggg 420

tcgggtggcg gcggatctgc tagcgcagtc cagctgcagc agtctggacc tgagctggaa 480

aagcctggcg cttcagtgaa gatttcctgc aaggcttctg gttactcatt cactggctac 540

aatatgaact gggtgaagca gaataatgga aagagccttg agtggattgg aaatattgat 600

ccttattatg gtggtactac ctacaaccgg aagttcaagg gcaaggccac attgactgta 660

gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcaagagtc tgacatctga ggactctgca 720

gtctattact gtgcaagatc ggtcggccct atggactact ggggtcaagg aacctcagtc 780

accgtctcga gcgagcccaa atcttctgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 840

cctgaactcc tgggtggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 900

atgatctccc ggaccectga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 960

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 1020

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 1080

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 1140
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1200

cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1260

ttctatccaa gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1320

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 1380

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1440

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaagtg actctaga 1498

<210> 205

<211> 492
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> G28-1 LH SMIP (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(127)
<223> VL
<220>
<221> misc_feature
<222> (128)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(260)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (261)..(275)
<223> Hinge

<400> 205

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn
35 40 45

Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
50 55 60

Gln Leu Leu Val Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser
100 105 110

Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser
130 135 140

Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
165 170 175

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
225 230 235 240

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
245 250 255

Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
260 265 270

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
275 280 285

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
290 295 300

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
305 310 315 320

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
325 330 335

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
340 345 350

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
355 360 365

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
370 375 380

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
385 390 395 400

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
405 410 415

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
420 425 430

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
435 440 445

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
450 455 460

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
465 470 475 480

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490

<210> 206
<211> 1522
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> G28-1 HL SMIP (ADN)

<400> 206
aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tcctgctact ctggctccca 60

gataccaccg gtgcggtcca gctgcagcag tctggacctg agtcggaaaa gcctggcgct 120

tcagtgaaga tttcctgcaa ggcttctggt tactcattca ctggctacaa tatgaactgg 180

gtgaagcaga ataatggaaa gagccttgag tggattggaa atattgatcc ttattatggt 240

ggtactacct acaaccggaa gttcaagggc aaggccacat tgactgtaga caaatcctcc 300

ggcacagcct acatgcagct caagagtctg acatctgagg actctgcagt ctattactgt 360

gcaagatcgg tcggccctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcttct 420

ggtggcggtg gctcgggcgg tggtgggtcg ggtggcggcg gatcaggagg aggcgggagt 480

gctagcgaca tccagatgac tcagtctcca gcctccctat ctgcatctgt gggagagact 540

gtcaccatca catgtcgaac aagtgaaaat gtttacagtt atttggcttg gtatcagcag 600

aaacagggaa aatctcctca gctcctggtc tcttttgcaa aaaccttagc agaaggtgtg 660

ccatcaaggt tcagtggcag tggatcaggc acacagtttt ctctgaagat cagcagcctg 720

cagcctgaag attctggaag ttatttctgt caacatcatt ccgataatcc gtggacgttc 780

ggtggaggca ccgaactgga gatcaaaggc tcgagcgagc ccaaatcttc tgacaaaact 840

cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctcctgggtg gaccgtcagt cttcctcttc 900

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg 960

gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 1020

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 1080

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1140

tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1200

cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1260

agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat ccaagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1320

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1380

ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1440

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1500

tctccgggta agtgactcta ga 1522

<210> 207
<211> 500
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> G28-1 HL SMIP (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(136)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (137)..(158)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (159)..(266)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(283)
<223> Hinge

<400> 207

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Ser Glu
20 25 30

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
35 40 45

Phe Thr Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser
50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr
65 70 75 80

Asn Arg Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser
85 90 95

Gly Thr Ala Tyr Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Asp Ile
145 150 155 160

Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr
165 170 175

Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr Leu Ala
180 185 190

Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Ser Phe
195 200 205

Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
210 215 220

Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
225 230 235 240

Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp Thr Phe
245 250 255

Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Gly Ser Ser Glu Pro Lys Ser
260 265 270

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
275 280 285

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
290 295 300

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
305 310 315 320

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
325 330 335

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
340 345 350

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
355 360 365

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
370 375 380

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
385 390 395 400

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
405 410 415

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
420 425 430

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
435 440 445

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
450 455 460

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
465 470 475 480

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
485 490 495

Ser Pro Gly Lys
500

<210> 208
<211> 1522
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> G19-4 LH SMIP (ADN)

<400> 208
aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tcctgctact ctggctccca 60

gataccaccg gtgacatcca gatgacacag actacatcct ccctgtctgc ctctctggga 120

gacagagtca ccatcagttg cagggcaagt caggacattc gcaattattt aaactggtat 180

cagcagaaac cagatggaac tgttaaactc ctgatctact acacatcaag attacactca 240

ggagtcccat caaggttcag tggcagtggg tctggaacag attattctct caccattgcc 300

aacctgcaac cagaagatat tgccacttac ttttgccaac agggtaatac gcttccgtgg 360

acgttcggtg gaggcaccaa actggtaacc aaacggggtg gcggtggctc gggcggtggt 420

ggatctggag gaggtgggag cgctagcgag gtccagctgc aacagtctgg acctgaactg 480

gtgaagcctg gagcttcaat gaagatttcc tgcaaggcct ctggttactc attcactggc 540

tacatcgtga actggctgaa gcagagccat ggaaagaacc ttgagtggat tggacttatt 600

aatccataca aaggtcttac tacctacaac cagaaattca agggcaaggc cacattaact 660

gtagacaagt catccagcac agcctacatg gagctcctca gtctgacatc tgaagactct 720

gcagtctatt actgtgcaag atctgggtac tatggtgact cggactggta cttcgatgtc 780

tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc tcgagcgagc ccaaatcttc tgacaaaact 840

cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctcctgggtg gaccgtcagt cttcctcttc 900

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg 960

gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 1020

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 1080

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1140

tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1200

cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1260

agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat ccaagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1320

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1380

ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1440

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1500

tctccgggta agtgactcta ga 1522

<210> 209
<211> 500
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> G19-4 LH SMIP (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(128)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)..(145)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (146)..(267)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature

<222> (268)..(282)
<223> Hinge

<400> 209

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ala
85 90 95

Asn Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn
100 105 110

Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Val Thr Lys Arg
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala
130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
145 150 155 160

Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly
165 170 175

Tyr Ile Val Asn Trp Leu Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp
180 185 190

Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Leu Thr Thr Tyr Asn Gln Lys

195 200 205

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
210 215 220

Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
225 230 235 240

Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val
245 250 255

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Glu Pro Lys Ser
260 265 270

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
275 280 285

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
290 295 300

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
305 310 315 320

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
325 330 335

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
340 345 350

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
355 360 365

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
370 375 380

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
385 390 395 400

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
405 410 415

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
420 425 430

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
435 440 445

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
450 455 460

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
465 470 475 480

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
485 490 495

Ser Pro Gly Lys
500

<210> 210
<211> 1525
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> G19-4 HL SMIP (ADN)

<400> 210
aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tcctgctact ctggctccca 60

gataccaccg gtgaggtcca gctgcaacag tctggacctg aactggtgaa gcctggagct 120

tcaatgaaga tttcctgcaa ggcctctggt tactcattca ctggctacat cgtgaactgg 180

ctgaagcaga gccatggaaa gaaccttgag tggattggac ttattaatcc atacaaaggt 240

cttactacct acaaccagaa attcaagggc aaggccacat tgactgtaga caagtcatcc 300

agcacagcct acatggagct cctcagtctg acatctgaag actctgcagt ctattactgt 360

gcaagatctg ggtactatgg tgactcagac tggtacttcg atgtctgggg cgcagggacc 420

acagtcaccg tctcctctgg cggcggtggc tcgggcggtg gtggatctgg aggaggtggg 480

agcgctagcg acatccagat gacacagact acatcctccc tgtctgcctc tctgggagac 540

agagtcacca tcagttgcag ggcaagtcag gacattcgca attatttgaa ctggtatcag 600

cagaaaccag atggaactgt taaactcctg atctactaca catcaagact acactcagga 660

gtcccatcaa ggttcagtgg cagtgggtct ggaacagatt attctctcac cattgccaac 720

ctgcaaccag aagatattgc cacttacttt tgccaacagg gtaatacact tccctggacg 780

ttcggtggag ggaccaaact ggtgaccaaa cgctcgagcg agcccaaatc ttctgacaaa 840

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg gtggaccgtc agtcttcctc 900

ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 960

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 1020

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 1080

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 1140

gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1200

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1260

gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccaagcg acatcgccgt ggagtgggag 1320

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1380

tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1440

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1500

ctgtctccgg gtaagtgact ctaga 1525

<210> 211
<211> 501
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> G19-4 HL SMIP (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(142)

<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (143)..(159)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (160)..(267)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (270)..(284)
<223> Hinge

<400> 211

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val
20 25 30

Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
35 40 45

Phe Thr Gly Tyr Ile Val Asn Trp Leu Lys Gln Ser His Gly Lys Asn
50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Leu Thr Thr Tyr
65 70 75 80

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr
115 120 125

Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Asp
145 150 155 160

Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp
165 170 175

Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu
180 185 190

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr
195 200 205

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
210 215 220

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gln Pro Glu
225 230 235 240

Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
245 250 255

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Val Thr Lys Arg Ser Ser Glu Pro Lys
260 265 270

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
275 280 285

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
290 295 300

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
305 310 315 320

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
325 330 335

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
340 345 350

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
355 360 365

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
370 375 380

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
385 390 395 400

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
405 410 415

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
420 425 430

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
435 440 445

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
450 455 460

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
465 470 475 480

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
485 490 495

Leu Ser Pro Gly Lys
500

<210> 212
<211> 2328
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> n2H7sssIgG1-STD1-2e12HL (ADN)

<400> 212
aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tcctgctact ctggctccca 60

gataccaccg gtcaaattgt tctctcccag tctccagcaa tcctgtctgc atctccaggg 120

gagaaggtca caatgacttg cagggccagc tcaagtgtaa gttacatgca ctggtaccag 180

cagaagccag gatcctcccc caaaccctgg atttatgccc catccaacct ggcttctgga 240

gtccctgctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcaga 300

gtggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccagcagt ggagttttaa cccacccacg 360

ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa gatggcggtg gctcgggcgg tggtggatct 420

ggaggaggtg gagctagcca ggcttatcta cagcagtctg gggctgagct ggtgaggcct 480

ggggcctcag tgaagatgtc ctgcaaggct tctggctaca catttaccag ttacaatatg 540

cactgggtaa agcagacacc tagacagggc ctggaatgga ttggagctat ttatccagga 600

aatggtgata cttcctacaa tcagaagttc aagggcaagg ccacactgac tgtagacaaa 660

tcctccagca cagcctacat gcagctcagc agcctgacat ctgaagactc tgcggtctat 720

ttctgtgcaa gagtggtgta ctatagtaac tcttactggt acttcgatgt ctggggcaca 780

gggaccacgg tcaccgtctc gagcgagccc aaatcttctg acaaaactca cacatcccca 840

ccgagcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 900

aaggacaccc tcatgatctc ccggaccccc gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 960

cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1020

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1080

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1140

ctcccagccc ccatcgagaa aacaatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1200

gtgtacaccc tgccccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1260

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1320

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1380

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1440

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaag 1500

aattatggtg gcggtggctc gggcggtggt ggatctggag gaggtgggag tgggaattct 1560

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc 1620

acatgcaccg tctcagggtt ctcattaacc ggctatggtg taaactgggt tcgccagcct 1680

ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg atatggggtg atggaagcac agactataat 1740

tcagctctca aatccagact atcgatcacc aaggacaact ccaagagcca agttttctta 1800

aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccagatact actgtgctcg agatggttat 1860

agtaactttc attactatgt tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 1920

tctgggggtg gaggctctgg tggcggtgga tccggcggag gtgggtcggg tggcggcgga 1980

tctgacattg tgctcaccca atctccagct tctttggctg tgtctctagg tcagagagcc 2040

accatctcct gcagagccag tgaaagtgtt gaatattatg tcacaagttt aatgcagtgg 2100

taccaacaga aaccaggaca gccacccaaa ctcctcatct ctgctgctag caacgtagaa 2160

tctggggtcc ctgccaggtt tagtggcagt gggtctggga cagactttag cctcaacatc 2220

catcctgtgg aggaggatga tattgcaatg tatttctgtc agcaaagtag gaaggttcca 2280

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgtt aatctaga 2328

<210> 213
<211> 769
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> n2H7sssIgG1-STD1-2e12HL (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(127)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (128)..(142)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (143)..(264)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature

<222> (265)..(279)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (497)..(516)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (517)..(637)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (638)..(657)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (658)..(769)
<223> VL2

<400> 213

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
35 40 45

Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
50 55 60

Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Asp Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Gln Ala
130 135 140

Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val
145 150 155 160

Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met
165 170 175

His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
180 185 190

Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
195 200 205

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
210 215 220

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
225 230 235 240

Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr
245 250 255

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
260 265 270

His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
275 280 285

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
290 295 300

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
305 310 315 320

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
325 330 335

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
340 345 350

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
355 360 365

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
370 375 380

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
385 390 395 400

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
405 410 415

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
420 425 430

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
435 440 445

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
450 455 460

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
465 470 475 480

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490 495

Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
500 505 510

Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
515 520 525

Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser
530 535 540

Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
545 550 555 560

Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn
565 570 575

Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser
580 585 590

Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg
595 600 605

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr Val Met
610 615 620

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
625 630 635 640

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
645 650 655

Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
660 665 670

Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr
675 680 685

Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
690 695 700

Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro
705 710 715 720

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile
725 730 735

His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser
740 745 750

Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
755 760 765

Arg

<210> 214
<211> 2313
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> n2H7sssIgG1-STD2-2e12LH (ADN)

<400> 214
aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tcctgctact ctggctccca 60

gataccaccg gtcaaattgt tctctcccag tctccagcaa tcctgtctgc atctccaggg 120

gagaaggtca caatgacttg cagggccagc tcaagtgtaa gttacatgca ctggtaccag 180

cagaagccag gatcctcccc caaaccctgg atttatgccc catccaacct ggcttctgga 240

gtccctgctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcaga 300

gtggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccagcagt ggagttttaa cccacccacg 360

ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa gatggcggtg gctcgggcgg tggtggatct 420

ggaggaggtg gagctagcca ggcttatcta cagcagtctg gggctgagct ggtgaggcct 480

ggggcctcag tgaagatgtc ctgcaaggct tctggctaca catttaccag ttacaatatg 540

cactgggtaa agcagacacc tagacagggc ctggaatgga ttggagctat ttatccagga 600

aatggtgata cttcctacaa tcagaagttc aagggcaagg ccacactgac tgtagacaaa 660

tcctccagca cagcctacat gcagctcagc agcctgacat ctgaagactc tgcggtctat 720

ttctgtgcaa gagtggtgta ctatagtaac tcttactggt acttcgatgt ctggggcaca 780

gggaccacgg tcaccgtctc gagcgagccc aaatcttctg acaaaactca cacatcccca 840

ccgagcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 900

aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 960

cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1020

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1080

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1140

ctcccagccc ccatcgagaa aacaatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1200

gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1260

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1320

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1380

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1440

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaag 1500

aattatggtg gcggtggctc gggcggtggt ggatctggag gaggtgggag tgggaattct 1560

gacattgtgc tcacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggtca gagagccacc 1620

atctcctgca gagccagtga aagtgttgaa tattatgtca caagtttaat gcagtggtac 1680

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctctg ctgctagcaa cgtagaatct 1740

ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag actttagcct caacatccat 1800

cctgtggagg aggatgatat tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaggaa ggttccatgg 1860

acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacggggtg gcggtggatc cggcggaggt 1920

gggtcgggtg gcggcggatc tcaggtgcag ctgaaggagt caggacctgg cctggtggcg 1980

ccctcacaga gcctgtccat cacatgcacc gtctcagggt tctcattaac cggctatggt 2040

gtaaactggg ttcgccagcc tccaggaaag ggtctggagt ggctgggaat gatatggggt 2100

gatggaagca cagactataa ttcagctctc aaatccagac tatcgatcac caaggacaac 2160

tccaagagcc aagttttctt aaaaatgaac agtctgcaaa ctgatgacac agccagatac 2220

tactgtgctc gagatggtta tagtaacttt cattactatg ttatggacta ctggggtcaa 2280

ggaacctcag tcaccgtctc ctcttaatct aga 2313

<210> 215
<211> 764
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> n2H7sssIgG1-STD2-2e12LH (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)

<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(126)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (127)..(142)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (143)..(264)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (265)..(279)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (497)..(516)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (517)..(628)
<223> VL2

<220>
<221> misc_feature
<222> (629)..(643)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (644)..(764)
<223> VH2

<400> 215

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
35 40 45

Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
50 55 60

Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Asp Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Gln Ala
130 135 140

Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val
145 150 155 160

Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met
165 170 175

His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
180 185 190

Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
195 200 205

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
210 215 220

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
225 230 235 240

Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr
245 250 255

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
260 265 270

His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
275 280 285

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
290 295 300

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
305 310 315 320

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
325 330 335

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
340 345 350

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
355 360 365

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
370 375 380

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
385 390 395 400

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
405 410 415

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
420 425 430

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
435 440 445

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
450 455 460

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
465 470 475 480

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490 495

Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
500 505 510

Ser Gly Asn Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
515 520 525

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
530 535 540

Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
545 550 555 560

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser
565 570 575

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
580 585 590

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys
595 600 605

Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
610 615 620

Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
625 630 635 640

Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
645 650 655

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
660 665 670

Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
675 680 685

Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser
690 695 700

Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
705 710 715 720

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr
725 730 735

Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr Val Met Asp
740 745 750

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
755 760

<210> 216
<211> 2048
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> n2H7sssIgG1-H1-2e12HL (ADN)

<400> 216
aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tcctgctact ctggctccca 60

gataccaccg gtcaaattgt tctctcccag tctccagcaa tcctgtctgc atctccaggg 120

gagaaggtca caatgacttg cagggccagc tcaagtgtaa gttacatgca ctggtaccag 180

cagaagccag gatcctcccc caaaccctgg atttatgccc catccaacct ggcttctgga 240

gtccctgctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcaga 300

gtggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccagcagt ggagttttaa cccacccacg 360

ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa gatggcggtg gctcgggcgg tggtggatct 420

ggaggaggtg gagctagcca ggcttatcta cagcagtctg gggctgagct ggtgaggcct 480

ggggcctcag tgaagatgtc ctgcaaggct tctggctaca catttaccag ttacaatatg 540

cactgggtaa agcagacacc tagacagggc ctggaatgga ttggagctat ttatccagga 600

aatggtgata cttcctacaa tcagaagttc aagggcaagg ccacactgac tgtagacaaa 660

tcctccagca cagcctacat gcagctcagc agcctgacat ctgaagactc tgcggtctat 720

ttctgtgcaa gagtggtgta ctatagtaac tcttactggt acttcgatgt ctggggcaca 780

gggaccacgg tcaccgtctc gagcgagccc aaatcttctg acaaaactca cacatcccca 840

ccgagcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 900

aaggacaccc tcatgatctc ccggaccccc gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 960

cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1020

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1080

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1140

ctcccagccc ccatcgagaa aacaatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1200

gtgtacaccc tgccccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1260

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1320

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1380

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1440

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaag 1500

aattctcagg tgcagctgaa ggagtcagga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg 1560

tccatcacat gcaccgtctc agggttctca ttaaccggct atggtgtaaa ctgggttcgc 1620

cagcctccag gaaagggtct ggagtggctg ggaatgatat ggggtgatgg aagcacagac 1680

tataattcag ctctcaaatc cagactatcg atcaccaagg acaactccaa gagccaagtt 1740

ttcttaaaaa tgaacagtct gcaaactgat gacacagcca gatactactg tgctcgagat 1800

ggttatagta actttcatta ctatgttatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 1860

gtctcctctg ggggtggagg ctctggtggc ggtggatccg gcggaggtgg gtcgggtggc 1920

ggcggatctg acattgtgct cacccaatct ccagcttctt tggctgtgtc tctaggtcag 1980

agagccacca tctcctgcag agccagtgaa agtgttgaat attatgtcac aagtttaatg 2040

cagtggta 2048

<210> 217
<211> 751
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> n2H7sssIgG1-H1-2e12HL (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(126)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (127)..(142)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (143)..(264)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (265)..(279)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (497)..(498)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (499)..(619)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (620)..(639)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (640)..(751)
<223> VL2

<400> 217

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
35 40 45

Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
50 55 60

Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Asp Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Gln Ala
130 135 140

Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val
145 150 155 160

Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met
165 170 175

His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
180 185 190

Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
195 200 205

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
210 215 220

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

225 230 235 240

Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr
245 250 255

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
260 265 270

His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
275 280 285

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
290 295 300

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
305 310 315 320

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
325 330 335

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
340 345 350

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
355 360 365

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
370 375 380

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
385 390 395 400

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
405 410 415

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
420 425 430

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
435 440 445

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
450 455 460

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
465 470 475 480

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490 495

Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro
500 505 510

Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
515 520 525

Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
530 535 540

Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala
545 550 555 560

Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val
565 570 575

Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr
580 585 590

Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr
595 600 605

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
610 615 620

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
625 630 635 640

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln
645 650 655

Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val
660 665 670

Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
675 680 685

Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg
690 695 700

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro
705 710 715 720

Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys
725 730 735

Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
740 745 750

<210> 218
<211> 2292
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> n2H7sssIgG1-H2-2e12HL (ADN)

<400> 218
aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tcctgctact ctggctccca 60

gataccaccg gtcaaattgt tctctcccag tctccagcaa tcctgtctgc atctccaggg 120

gagaaggtca caatgacttg cagggccagc tcaagtgtaa gttacatgca ctggtaccag 180

cagaagccag gatcctcccc caaaccctgg atttatgccc catccaacct ggcttctgga 240

gtccctgctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcaga 300

gtggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccagcagt ggagttttaa cccacccacg 360

ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa gatggcggtg gctcgggcgg tggtggatct 420

ggaggaggtg gagctagcca ggcttatcta cagcagtctg gggctgagct ggtgaggcct 480

ggggcctcag tgaagatgtc ctgcaaggct tctggctaca catttaccag ttacaatatg 540

cactgggtaa agcagacacc tagacagggc ctggaatgga ttggagctat ttatccagga 600

aatggtgata cttcctacaa tcagaagttc aagggcaagg ccacactgac tgtagacaaa 660

tcctccagca cagcctacat gcagctcagc agcctgacat ctgaagactc tgcggtctat 720

ttctgtgcaa gagtggtgta ctatagtaac tcttactggt acttcgatgt ctggggcaca 780

gggaccacgg tcaccgtctc gagcgagccc aaatcttctg acaaaactca cacatcccca 840

ccgagcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 900

aaggacaccc tcatgatctc ccggaccccc gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 960

cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1020

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1080

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1140

ctcccagccc ccatcgagaa aacaatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1200

gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1260

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1320

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1380

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1440

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaag 1500

ggtggcggtg gctcggggaa ttctcaggtg cagctgaagg agtcaggacc tggcctggtg 1560

gcgccctcac agagcctgtc catcacatgc accgtctcag ggttctcatt aaccggctat 1620

ggtgtaaact gggttcgcca gcctccagga aagggtctgg agtggctggg aatgatatgg 1680

ggtgatggaa gcacagacta taattcagct ctcaaatcca gactatcgat caccaaggac 1740

aactccaaga gccaagtttt cttaaaaatg aacagtctgc aaactgatga cacagccaga 1800

tactactgtg ctcgagatgg ttatagtaac tttcattact atgttatgga ctactggggt 1860

caaggaacct cagtcaccgt ctcctctggg ggtggaggct ctggtggcgg tggatccggc 1920

ggaggtgggt cgggtggcgg cggatctgac attgtgctca cccaatctcc agcttctttg 1980

gctgtgtctc taggtcagag agccaccatc tcctgcagag ccagtgaaag tgttgaatat 2040

tatgtcacaa gtttaatgca gtggtaccaa cagaaaccag gacagccacc caaactcctc 2100

atctctgctg ctagcaacgt agaatctggg gtccctgcca ggtttagtgg cagtgggtct 2160

gggacagact ttagcctcaa catccatcct gtggaggagg atgatattgc aatgtatttc 2220

tgtcagcaaa gtaggaaggt tccatggacg ttcggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa 2280

<210> 219
<211> 757
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> n2H7sssIgG1-H2-2e12HL (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(126)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (127)..(142)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (143)..(264)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (265)..(279)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (497)..(504)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (505)..(625)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (626)..(645)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (646)..(757)
<223> VL2

<400> 219

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
35 40 45

Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
50 55 60

Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Asp Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Gln Ala
130 135 140

Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val
145 150 155 160

Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met
165 170 175

His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
180 185 190

Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
195 200 205

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
210 215 220

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
225 230 235 240

Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr
245 250 255

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
260 265 270

His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
275 280 285

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
290 295 300

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
305 310 315 320

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
325 330 335

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
340 345 350

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
355 360 365

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
370 375 380

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
385 390 395 400

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

405 410 415

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
420 425 430

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
435 440 445

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
450 455 460

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
465 470 475 480

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490 495

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly
500 505 510

Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val
515 520 525

Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro
530 535 540

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser
545 550 555 560

Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp
565 570 575

Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp
580 585 590

Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His
595 600 605

Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
610 615 620

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
625 630 635 640

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
645 650 655

Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
660 665 670

Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys
675 680 685

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu
690 695 700

Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
705 710 715 720

Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe
725 730 735

Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
740 745 750

Leu Glu Ile Lys Arg
755

<210> 220
<211> 2298
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> n2H7sssIgG1-H3-2e12HL (ADN)

<400> 220
aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tcctgctact ctggctccca 60

gataccaccg gtcaaattgt tctctcccag tctccagcaa tcctgtctgc atctccaggg 120

gagaaggtca caatgacttg cagggccagc tcaagtgtaa gttacatgca ctggtaccag 180

cagaagccag gatcctcccc caaaccctgg atttatgccc catccaacct ggcttctgga 240

gtccctgctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcaga 300

gtggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccagcagt ggagttttaa cccacccacg 360

ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa gatggcggtg gctcgggcgg tggtggatct 420

ggaggaggtg gagctagcca ggcttatcta cagcagtctg gggctgagct ggtgaggcct 480

ggggcctcag tgaagatgtc ctgcaaggct tctggctaca catttaccag ttacaatatg 540

cactgggtaa agcagacacc tagacagggc ctggaatgga ttggagctat ttatccagga 600

aatggtgata cttcctacaa tcagaagttc aagggcaagg ccacactgac tgtagacaaa 660

tcctccagca cagcctacat gcagctcagc agcctgacat ctgaagactc tgcggtctat 720

ttctgtgcaa gagtggtgta ctatagtaac tcttactggt acttcgatgt ctggggcaca 780

gggaccacgg tcaccgtctc gagcgagccc aaatcttctg acaaaactca cacatcccca 840

ccgagcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 900

aaggacaccc tcatgatctc ccggaccccc gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 960

cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1020

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1080

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1140

ctcccagccc ccatcgagaa aacaatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1200

gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1260

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1320

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1380

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1440

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaag 1500

aattatggtg gcggtggctc tgggaattct caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc 1560

ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc acatgcaccg tctcagggtt ctcattaacc 1620

ggctatggtg taaactgggt tcgccagcct ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg 1680

atatggggtg atggaagcac agactataat tcagctctca aatccagact atcgatcacc 1740

aaggacaact ccaagagcca agttttctta aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca 1800

691

gccagatact actgtgctcg agatggttat agtaactttc attactatgt tatggactac 1860

tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tctgggggtg gaggctctgg tggcggtgga 1920

tccggcggag gtgggtcggg tggcggcgga tctgacattg tgctcaccca atctccagct 1980

tctttggctg tgtctctagg tcagagagcc accatctcct gcagagccag tgaaagtgtt 2040

gaatattatg tcacaagttt aatgcagtgg taccaacaga aaccaggaca gccacccaaa 2100

ctcctcatct ctgctgctag caacgtagaa tctggggtcc ctgccaggtt tagtggcagt 2160

gggtctggga cagactttag cctcaacatc catcctgtgg aggaggatga tattgcaatg 2220

tatttctgtc agcaaagtag gaaggttcca tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa 2280

atcaaacgtt aatctaga 2298

<210> 221
<211> 759
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> n2H7sssIgG1-H3-2e12HL (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(126)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (127)..(142)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (143)..(264)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (265)..(279)
<223> Hinge

ORDEN DE PRESTACIÓN
DE SERVICIOS PI No CSP-2008-000955

Universidad Nacional Abierta y a Distancia

CLASE DE CONTRATO:	***ORDEN DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS DE PRODUCCIÓN INTELECTUAL***
CONTRATISTA:	***JULIE GHIMENTI RODRIGUEZ***
DIRECCIÓN:	***CARRERA 49 B No 103 B - 34***
TELEFONO:	***2570208***
OBJETO:	***APOYAR LOS SERVICIOS INHERENTES AL DESARROLLO EN EL PROYECTO DE DISEÑO, INTEGRACIÓN, MODIFICACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE LA PLATAFORMA E-LEARNING DE LA UNIVERSIDAD EN LAS ÁREAS DE REGISTRO Y CONTRO ACADÉMICO Y VIMMEP, DE CONFORMIDAD CON LOS TÉRMINOS DE REFERENCIA, LOS CUALES HACEN PARTE INTEGRAL DE LA ORDEN.***
VALOR:	***$5.400.000,00***
IDENTIFICACIÓN:	***CEDULA DE CIUDADANIA No. 53.000.967 de Bogotá***
CUENTA PARA PAGO:	***012476271***
BANCO:	***Bogotá***
TIPO DE CUENTA:	***Ahorros***

Entre los suscritos a saber **PIEDAD ARCINIEGAS PINZON** mayor de edad, vecina de Bogotá, D.C., identificada con la cédula de ciudadanía No.41.528.596 expedida en Bogotá, en su calidad de Gerente Administrativa y Financiera de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD, Ente Universitario Autónomo, transformada mediante Decreto 2770 del 16 de agosto de 2006, vinculada al Ministerio de Educación Nacional, con Nit No. 860.512.780-4 y con facultades delegatarias para contratar, según resolución No 0230 del 16 de Febrero de 2007, quien para efectos de este contrato se denominará la UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA – UNAD, por una parte, y por la otra, **JULIE GHIMENTI RODRIGUEZ**, quien se identifica con CEDULA DE CIUDADANIA No. 53.000.967 de Bogotá, y quien actúa en nombre propio y manifiesta expresamente bajo la gravedad del juramento no estar incurso en alguna de las situaciones de incompatibilidad y conflicto de intereses a que se refieren los artículos 3 y 4 del Acuerdo Número 007 de octubre 05 de 2006, quien para los efectos de este contrato se denominará el CONTRATISTA, hemos convenido en celebrar la presente Orden de Prestación de Servicios de Producción Intelectual de conformidad con el artículo 93 de la Ley 30 de 1992, el Estatuto de Contratación de la UNAD y el Manual de Procesos y Procedimientos de la UNAD, normas civiles y comerciales concordantes previa la siguiente consideración: **1.** Que existen los recursos presupuestales necesarios, para atender el pago del valor del presente contrato **2**. Igualmente el presente contrato se regirá por la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Ley 33 de 1987, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995, Decisión 344 del 21 de Octubre de 1993 y demás normas generales sobre la materia. **3.** Que no existe personal de planta que desarrolle las siguientes funciones; **4.** Que habiéndose dado cumplimiento a todos los trámites y requisitos que exige la contratación, es procedente la celebración del presente contrato y/o orden de prestación de servicios de Producción Intelectual y de acuerdo a las siguientes cláusulas: **PRIMERA.- OBJETO** APOYAR LOS SERVICIOS INHERENTES AL DESARROLLO EN EL PROYECTO DE DISEÑO, INTEGRACIÓN, MODIFICACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE LA PLATAFORMA E-

391

<220>
<221> misc_feature
<222> (497)..(506)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (507)..(627)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (628)..(647)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (648)..(759)
<223> VL2

<400> 221

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
35 40 45

Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
50 55 60

Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Asp Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Gln Ala
130 135 140

Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val
145 150 155 160

Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met
165 170 175

His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
180 185 190

Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
195 200 205

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
210 215 220

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
225 230 235 240

Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr
245 250 255

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
260 265 270

His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
275 280 285

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
290 295 300

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
305 310 315 320

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
325 330 335

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

340 345 350

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
355 360 365

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
370 375 380

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
385 390 395 400

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
405 410 415

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
420 425 430

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
435 440 445

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
450 455 460

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
465 470 475 480

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490 495

Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu
500 505 510

Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys
515 520 525

Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg
530 535 540

Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp
545 550 555 560

Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr
565 570 575

Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln
580 585 590

Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn
595 600 605

Phe His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
610 615 620

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
625 630 635 640

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
645 650 655

Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala
660 665 670

Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln
675 680 685

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn
690 695 700

Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
705 710 715 720

Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met
725 730 735

Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly
740 745 750

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
755

<210> 222
<211> 2307
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> n2H7sssIgG1-H4-2e12HL (ADN)

<400> 222
aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tcctgctact ctggctccca 60

gataccaccg gtcaaattgt tctctcccag tctccagcaa tcctgtctgc atctccaggg 120

gagaaggtca caatgacttg cagggccagc tcaagtgtaa gttacatgca ctggtaccag 180

cagaagccag gatcctcccc caaaccctgg atttatgccc catccaacct ggcttctgga 240

gtccctgctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcaga 300

gtggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccagcagt ggagttttaa cccacccacg 360

ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa gatggcggtg gctcgggcgg tggtggatct 420

ggaggaggtg gagctagcca ggcttatcta cagcagtctg gggctgagct ggtgaggcct 480

ggggcctcag tgaagatgtc ctgcaaggct tctggctaca catttaccag ttacaatatg 540

cactgggtaa agcagacacc tagacagggc ctggaatgga ttggagctat ttatccagga 600

aatggtgata cttcctacaa tcagaagttc aagggcaagg ccacactgac tgtagacaaa 660

tcctccagca cagcctacat gcagctcagc agcctgacat ctgaagactc tgcggtctat 720

ttctgtgcaa gagtggtgta ctatagtaac tcttactggt acttcgatgt ctggggcaca 780

gggaccacgg tcaccgtctc gagcgagccc aaatcttctg acaaaactca cacatcccca 840

ccgagcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 900

aaggacaccc tcatgatctc ccggaccccc gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 960

cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1020

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1080

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1140

ctcccagccc ccatcgagaa aacaatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1200

gtgtacaccc tgccccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1260

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1320

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1380

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1440

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaag 1500

ggtggcggtg gctcgggcgg tggtggatct gggaattctc aggtgcagct gaaggagtca 1560

ggacctggcc tggtggcgcc ctcacagagc ctgtccatca catgcaccgt ctcagggttc 1620

tcattaaccg gctatggtgt aaactgggtt cgccagcctc caggaaaggg tctggagtgg 1680

ctgggaatga tatggggtga tggaagcaca gactataatt cagctctcaa atccagacta 1740

tcgatcacca aggacaactc caagagccaa gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaact 1800

gatgacacag ccagatacta ctgtgctcga gatggttata gtaactttca ttactatgtt 1860

atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct ctgggggtgg aggctctggt 1920

ggcggtggat ccggcggagg tgggtcgggt ggcggcggat ctgacattgt gctcacccaa 1980

tctccagctt ctttggctgt gtctctaggt cagagagcca ccatctcctg cagagccagt 2040

gaaagtgttg aatattatgt cacaagttta atgcagtggt accaacagaa accaggacag 2100

ccacccaaac tcctcatctc tgctgctagc aacgtagaat ctggggtccc tgccaggttt 2160

agtggcagtg ggtctgggac agactttagc ctcaacatcc atcctgtgga ggaggatgat 2220

attgcaatgt atttctgtca gcaaagtagg aaggttccat ggacgttcgg tggaggcacc 2280

aagctggaaa tcaaacgtta atctaga 2307

<210> 223
<211> 762
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> n2H7sssIgG1-H4-2e12HL (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(126)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (127)..(142)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (143)..(264)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (265)..(279)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (497)..(509)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (510)..(630)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (631)..(650)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (651)..(762)
<223> VL2

<400> 223

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
35 40 45

Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
50 55 60

Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Asp Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Gln Ala
130 135 140

Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val
145 150 155 160

Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met
165 170 175

His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
180 185 190

Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
195 200 205

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
210 215 220

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
225 230 235 240

Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr
245 250 255

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
260 265 270

His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
275 280 285

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
290 295 300

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
305 310 315 320

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
325 330 335

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
340 345 350

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
355 360 365

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
370 375 380

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
385 390 395 400

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
405 410 415

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
420 425 430

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
435 440 445

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
450 455 460

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
465 470 475 480

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490 495

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln

500 505 510

Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser
515 520 525

Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn
530 535 540

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile
545 550 555 560

Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu
565 570 575

Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn
580 585 590

Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly
595 600 605

Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
610 615 620

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
625 630 635 640

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln
645 650 655

Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser
660 665 670

Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln
675 680 685

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala
690 695 700

Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
705 710 715 720

Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp
725 730 735

Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe
740 745 750

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
755 760

<210> 224
<211> 2313
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> n2H7sssIgG1-H5-2e12HL (ADN)

<400> 224
aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tcctgctact ctggctccca 60

gataccaccg gtcaaattgt tctctcccag tctccagcaa tcctgtctgc atctccaggg 120

gagaaggtca caatgacttg cagggccagc tcaagtgtaa gttacatgca ctggtaccag 180

cagaagccag gatcctcccc caaaccctgg atttatgccc catccaacct ggcttctgga 240

gtccctgctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcaga 300

gtggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccagcagt ggagttttaa cccacccacg 360

ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa gatggcggtg gctcgggcgg tggtggatct 420

ggaggaggtg gagctagcca ggcttatcta cagcagtctg gggctgagct ggtgaggcct 480

ggggcctcag tgaagatgtc ctgcaaggct tctggctaca catttaccag ttacaatatg 540

cactgggtaa agcagacacc tagacagggc ctggaatgga ttggagctat ttatccagga 600

aatggtgata cttcctacaa tcagaagttc aagggcaagg ccacactgac tgtagacaaa 660

tcctccagca cagcctacat gcagctcagc agcctgacat ctgaagactc tgcggtctat 720

ttctgtgcaa gagtggtgta ctatagtaac tcttactggt acttcgatgt ctggggcaca 780

gggaccacgg tcaccgtctc gagcgagccc aaatcttctg acaaaactca cacatcccca 840

ccgagcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 900

602

aaggacaccc tcatgatctc ccggaccccc gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 960

cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1020

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1080

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1140

ctcccagccc ccatcgagaa aacaatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1200

gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1260

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1320

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1380

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1440

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaag 1500

aattatggtg gcggtggctc gggcggtggt ggatctggga attctcaggt gcagctgaag 1560

gagtcaggac ctggcctggt ggcgccctca cagagcctgt ccatcacatg caccgtctca 1620

gggttctcat taaccggcta tggtgtaaac tgggttcgcc agcctccagg aaagggtctg 1680

gagtggctgg gaatgatatg gggtgatgga agcacagact ataattcagc tctcaaatcc 1740

agactatcga tcaccaagga caactccaag agccaagttt tcttaaaaat gaacagtctg 1800

caaactgatg acacagccag atactactgt gctcgagatg gttatagtaa ctttcattac 1860

tatgttatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctctgg gggtggaggc 1920

tctggtggcg gtggatccgg cggaggtggg tcgggtggcg gcggatctga cattgtgctc 1980

acccaatctc cagcttcttt ggctgtgtct ctaggtcaga gagccaccat ctcctgcaga 2040

gccagtgaaa gtgttgaata ttatgtcaca agtttaatgc agtggtacca acagaaacca 2100

ggacagccac ccaaactcct catctctgct gctagcaacg tagaatctgg ggtccctgcc 2160

aggtttagtg gcagtgggtc tgggacagac tttagcctca acatccatcc tgtggaggag 2220

gatgatattg caatgtattt ctgtcagcaa agtaggaagg ttccatggac gttcggtgga 2280

ggcaccaagc tggaaatcaa acgttaatct aga 2313

<210> 225
<211> 764
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> n2H7sssIgG1-H5-2e12HL (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(126)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (127)..(142)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (143)..(264)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (265)..(279)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (497)..(511)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (512)..(632)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (633)..(652)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (653)..(764)
<223> VL2

<400> 225

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
35 40 45

Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
50 55 60

Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Asp Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Gln Ala
130 135 140

Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val
145 150 155 160

Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met
165 170 175

His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
180 185 190

Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
195 200 205

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
210 215 220

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
225 230 235 240

Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr
245 250 255

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
260 265 270

His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
275 280 285

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
290 295 300

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
305 310 315 320

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
325 330 335

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
340 345 350

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
355 360 365

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
370 375 380

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
385 390 395 400

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
405 410 415

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
420 425 430

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
435 440 445

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
450 455 460

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
465 470 475 480

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490 495

Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln
500 505 510

Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser
515 520 525

Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly
530 535 540

Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
545 550 555 560

Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
565 570 575

Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
580 585 590

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg
595 600 605

Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
610 615 620

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
625 630 635 640

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu
645 650 655

Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr

660 665 670

Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu
675 680 685

Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
690 695 700

Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
705 710 715 720

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu
725 730 735

Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp
740 745 750

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
755 760

<210> 226
<211> 2322
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> n2H7sssIgG1-H6-2e12HL (ADN)

<400> 226
aagcttgccg ccatggaagc accagcgcag cttctcttcc tcctgctact ctggctccca 60

gataccaccg gtcaaattgt tctctcccag tctccagcaa tcctgtctgc atctccaggg 120

gagaaggtca caatgacttg cagggccagc tcaagtgtaa gttacatgca ctggtaccag 180

cagaagccag gatcctcccc caaaccctgg atttatgccc catccaacct ggcttctgga 240

gtccctgctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcaga 300

gtggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccagcagt ggagttttaa cccacccacg 360

ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa gatggcggtg gctcgggcgg tggtggatct 420

ggaggaggtg gagctagcca ggcttatcta cagcagtctg gggctgagct ggtgaggcct 480

ggggcctcag tgaagatgtc ctgcaaggct tctggctaca catttaccag ttacaatatg 540

cactgggtaa agcagacacc tagacagggc ctggaatgga ttggagctat ttatccagga 600

aatggtgata cttcctacaa tcagaagttc aagggcaagg ccacactgac tgtagacaaa 660

tcctccagca cagcctacat gcagctcagc agcctgacat ctgaagactc tgcggtctat 720

ttctgtgcaa gagtggtgta ctatagtaac tcttactggt acttcgatgt ctggggcaca 780

gggaccacgg tcaccgtctc gagcgagccc aaatcttctg acaaaactca cacatcccca 840

ccgagcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 900

aaggacaccc tcatgatctc ccggaccccc gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 960

cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1020

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1080

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1140

ctcccagccc ccatcgagaa aacaatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1200

gtgtacaccc tgccccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1260

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1320

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1380

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1440

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaag 1500

ggtggcggtg gctcgggcgg tggtggatct gggggaggag gcagcgggaa ttctcaggtg 1560

cagctgaagg agtcaggacc tggcctggtg gcgccctcac agagcctgtc catcacatgc 1620

accgtctcag ggttctcatt aaccggctat ggtgtaaact gggttcgcca gcctccagga 1680

aagggtctgg agtggctggg aatgatatgg ggtgatggaa gcacagacta taattcagct 1740

ctcaaatcca gactatcgat caccaaggac aactccaaga gccaagtttt cttaaaaatg 1800

aacagtctgc aaactgatga cacagccaga tactactgtg ctcgagatgg ttatagtaac 1860

tttcattact atgttatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctctggg 1920

ggtggaggct ctggtggcgg tggatccggc ggaggtgggt cgggtggcgg cggatctgac 1980

attgtgctca cccaatctcc agcttctttg gctgtgtctc taggtcagag agccaccatc 2040

tcctgcagag ccagtgaaag tgttgaatat tatgtcacaa gtttaatgca gtggtaccaa 2100

cagaaaccag gacagccacc caaactcctc atctctgctg ctagcaacgt agaatctggg 2160

gtccctgcca ggtttagtgg cagtgggtct gggacagact ttagcctcaa catccatcct 2220

gtggaggagg atgatattgc aatgtatttc tgtcagcaaa gtaggaaggt tccatggacg 2280

ttcggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa cgttaatcta ga 2322

<210> 227
<211> 767
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> n2H7sssIgG1-H6-2e12HL (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(126)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (127)..(142)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (143)..(264)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (265)..(279)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (497)..(514)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (515)..(635)

<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (636)..(655)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (656)..(767)
<223> VL2

<400> 227

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
35 40 45

Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
50 55 60

Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Asp Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Gln Ala
130 135 140

Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val
145 150 155 160

Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met
165 170 175

His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
180 185 190

Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
195 200 205

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
210 215 220

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
225 230 235 240

Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr
245 250 255

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
260 265 270

His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
275 280 285

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
290 295 300

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
305 310 315 320

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
325 330 335

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
340 345 350

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
355 360 365

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
370 375 380

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
385 390 395 400

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
405 410 415

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
420 425 430

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
435 440 445

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
450 455 460

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
465 470 475 480

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490 495

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
500 505 510

Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro
515 520 525

Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
530 535 540

Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
545 550 555 560

Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala
565 570 575

Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val
580 585 590

Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr
595 600 605

Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr
610 615 620

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
625 630 635 640

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
645 650 655

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln
660 665 670

Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val
675 680 685

Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
690 695 700

Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg
705 710 715 720

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro
725 730 735

Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys
740 745 750

Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
755 760 765

<210> 228
<211> 2337
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> 2H7sssIgG1-H7-G281 HL (ADN)

<400> 228
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60

gtcataatgt ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120

ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180

taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240

tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300

agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360

cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420

ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagtcggtg 480

aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540

aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600

ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660

gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720

gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780

ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttgtga caaaactcac 840

acatccccac cgtgctcagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500

ccgggtaaga attatggtgg cggtggctcg ggcggtggtg gatctggagg aggtgggagt 1560

gggaattctc aggtgcagct gaaggagtca ggacctggcc tggtggcgcc ctcacagagc 1620

ctgtccatca catgcaccgt ctcagggttc tcattaaccg gctatggtgt aaactgggtt 1680

cgccagcctc caggaaaggg tctggagtgg ctgggaatga tatggggtga tggaagcaca 1740

gactataatt cagctctcaa atccagacta tcgatcacca aggacaactc caagagccaa 1800

gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaact gatgacacag ccagatacta ctgtgctcga 1860

gatggttata gtaactttca ttactatgtt atggactact ggggtcaagg aacctcagtc 1920

accgtctcct ctgggggtgg aggctctggt ggcggtggat ccggcggagg tgggtcgggt 1980

ggcggcggat ctgacattgt gctcacccaa tctccagctt ctttggctgt gtctctaggt 2040

cagagagcca ccatctcctg cagagccagt gaaagtgttg aatattatgt cacaagttta 2100

atgcagtggt accaacagaa accaggacag ccacccaaac tcctcatctc tgctgctagc 2160

aacgtagaat ctggggtccc tgccaggttt agtggcagtg ggtctgggac agactttagc 2220

ctcaacatcc atcctgtgga ggaggatgat attgcaatgt atttctgtca gcaaagtagg 2280

aaggttccat ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa tcaaacgtta atctaga 2337

<210> 229
<211> 772
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> 2H7scIgG1-STD1-2e12HL (w/2E12 Líder) (AA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Líder

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(128)
<223> VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)..(144)
<223> Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)..(265)
<223> VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(282)
<223> Hinge

<220>
<221> misc_feature
<222> (500)..(519)
<223> EFD-BD2 Vinculador

<220>
<221> misc_feature
<222> (520)..(640)
<223> VH2

<220>
<221> misc_feature
<222> (641)..(660)
<223> Vinculador2

<220>
<221> misc_feature
<222> (661)..(772)
<223> VL2

<400> 229

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Cys
260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly
275 280 285

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
500 505 510

Gly Gly Gly Ser Gly Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro
515 520 525

Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser
530 535 540

Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro
545 550 555 560

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr
565 570 575

Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn
580 585 590

Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp
595 600 605

Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Asn Phe His Tyr
610 615 620

Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
625 630 635 640

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
645 650 655

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
660 665 670

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
675 680 685

Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
690 695 700

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser
705 710 715 720

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
725 730 735

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys
740 745 750

Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
755 760 765

Glu Ile Lys Arg
770

<210> 230
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> scs(s) -hIgG1 (ADN)

<400> 230
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tctccaccga gctca 45

<210> 231
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> scs(s) -hIgG1 (AA)

<400> 231

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15

<210> 232
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> ccc(s) (ADN)

<400> 232
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tctccaccgt gctca 45

<210> 233

<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> ccc(s) (AA)

<400> 233

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Ser
1 5 10 15

<210> 234
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H8 (PN)

<400> 234
gggtctccac cttctccgaa ttct 24

<210> 235
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 235

Gly Ser Pro Pro Ser Pro Asn Ser
1 5

<210> 236
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H9 (PN)

<400> 236
tctccacctt ctccgaattc t 21

<210> 237
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H9 (AA)

<400> 237

Ser Pro Pro Ser Pro Asn Ser
1 5

<210> 238

<400> 238
000

<210> 239

<400> 239
000

<210> 240
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H11 (PN)

<400> 240
gagcccacat ctaccgacaa aactcacaca tctccaccca gcccgaattc t 51

<210> 241
<211> 17
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H11 (AA)

<400> 241

Glu Pro Thr Ser Thr Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Asn
1 5 10 15

Ser

<210> 242
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H12 (PN)

<400> 242
gagcccacat ctaccgacaa aactcacaca tctccaccca gcccgaattc t 51

<210> 243
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H12 (AA)

<400> 243

Glu Pro Thr Ser Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Asn
1 5 10 15

Ser

<210> 244
<211> 51
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H13 (PN)

<400> 244
gagcccacat ctaccgacaa aactcacaca tctccaccca gcccgaattc t 51

<210> 245
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H13 (AA)

<400> 245

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Asn
1 5 10 15

Ser

<210> 246
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H15 (PN)

<400> 246
ggcggtggtg gctcctgtcc accttgtccg aattct 36

<210> 247
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H15 (AA)

<400> 247

Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser
1 5 10

<210> 248
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H16 (PN)

<400> 248
ctgtctgtga aagctgactt cctcactcca tccatcggga attct 45

<210> 249
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H16 (AA)

<400> 249

Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Leu Thr Pro Ser Ile Gly Asn Ser
1 5 10 15

<210> 250
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H17 (PN)

<400> 250
ctgtctgtga aagctgactt cctcactcca tccatctcct gtccaccttg cccgaattct 60

<210> 251
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H17 (AA)

<400> 251

Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Leu Thr Pro Ser Ile Ser Cys Pro Pro
1 5 10 15

Cys Pro Asn Ser
20

<210> 252
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H18 (PN)

<400> 252
ctgtctgtgc tcgctaactt cagtcagcca gagatcggga attct 45

<210> 253
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H18 (AA)

<400> 253

Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Gly Asn Ser
1 5 10 15

<210> 254
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H19 (PN)

<400> 254
ctgtctgtgc tcgctaactt cagtcagcca gagatctcct gtccaccttg cccgaattct 60

<210> 255
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H19 (AA)

<400> 255

Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Ser Cys Pro Pro
1 5 10 15

Cys Pro Asn Ser
20

<210> 256
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H20 (PN)

<400> 256
ctgaaaatcc aggagagggt cagtaagcca aagatctcga attct 45

<210> 257
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H20 (AA)

<400> 257

Leu Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Asn Ser
1 5 10 15

<210> 258
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> Vinculador H21 (PN)

<400> 258
ctgaaaatcc aggagagggt cagtaagcca aagatctcct gtccaccttg cccgaattct 60

<210> 259
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H21 (AA)

<400> 259

Leu Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Cys Pro Pro
1 5 10 15

Cys Pro Asn Ser
20

<210> 260
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
<223> Vinculador H22 (PN)

<400> 260
ctggatgtga gtgagaggcc ttttcctcca cacatccaga attct 45

<210> 261
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H22 (AA)

<400> 261

Leu Asp Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Asn Ser
1 5 10 15

<210> 262
<211> 63
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H23 (PN)

<400> 262

ctggatgtga gtgagaggcc ttttcctcca cacatccagt cctgtccacc ttgcccgaat 60

tct 63

<210> 263
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H23 (AA)

<400> 263

Leu Asp Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Ser Cys Pro
1 5 10 15

Pro Cys Pro Asn Ser
20

<210> 264
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H24 (ADN)

<400> 264
cgggaacagc tggcagaggt cactttgagc ttgaaagcga attct 45

<210> 265
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H24 (AA)

<400> 265

Arg Glu Gln Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Leu Lys Ala Asn Ser
1 5 10 15

<210> 266
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H25 (PN)

<400> 266
cgggaacagc tggcagaggt cactttgagc gtgaaagctt gtccaccctg cccgaattct 60

<210> 267
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H25 (AA)

<400> 267

Arg Glu Gln Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Leu Lys Ala Cys Pro Pro
1 5 10 15

Cys Pro Asn Ser
20

<210> 268
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H26 (PN)

<400> 268
cggattcacc agatgaactc cgagttgagc gtgctcgcga attct 45

<210> 269
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H26 (AA)

<400> 269

Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Ser
1 5 10 15

<210> 270
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H27 (PN)

<400> 270
cggattcacc agatgaactc cgagttgagc gtgctcgctt gtccaccctg cccgaattct 60

<210> 271
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H27 (AA)

<400> 271

Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Cys Pro Pro
1 5 10 15

Cys Pro Asn Ser
20

<210> 272
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H28 (PN)

<400> 272
gataccaaag ggaagaacgt cctcgagaag atcttctcga attct 45

<210> 273
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H28 (AA)

<400> 273

Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Ser Asn Ser
1 5 10 15

<210> 274
<211> 63
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H29 (PN)

<400> 274
gataccaaag ggaagaacgt cctcgagaag atcttcgact cctgtccacc ttgcccgaat 60

<210> 275
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H29 (AA)

<400> 275

Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Ser Cys Pro
1 5 10 15

Pro Cys Pro Asn Ser
20

<210> 276
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H30 (PN)

<400> 276
ctgccacctg agacacagga gagtcaagaa gtcaccctga attct 45

<210> 277
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H30 (AA)

<400> 277

Leu Pro Pro Glu Thr Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Asn Ser
1 5 10 15

<210> 278
<211> 63
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H31 (PN)

<400> 278
ctgccacctg agacacagga gagtcaagaa gtcaccctgt cctgtccacc ttgcccgaat 60

tct 63

<210> 279
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H31 (AA)

<400> 279

Leu Pro Pro Glu Thr Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Ser Cys Pro
1 5 10 15

Pro Cys Pro Asn Ser
20

<210> 280
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H32 (PN)

<400> 280
cggattcacc tgaacgtgtc cgagaggccc tttcctccga attct 45

<210> 281
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H32 (AA)

<400> 281

Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro Asn Ser
1 5 10 15

<210> 282
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H33 (PN)

<400> 282
cggattcacc tgaacgtgtc cgagaggccc tttcctccct gtccaccctg cccgaattct 60

<210> 283
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H33 (AA)

<400> 283

Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro Cys Pro Pro
1 5 10 15

Cys Pro Asn Ser
20

<210> 284

<400> 284
000

<210> 285

<400> 285
000

<210> 286

<400> 286
000

<210> 287

<400> 287
000

<210> 288
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H36 (PN)

<400> 288
gggtgtccac cttgtccagg cggtggtgga tcgaattct 39

<210> 289
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H36 (AA)

<400> 289

Gly Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ser
1 5 10

<210> 290

<400> 290
000

<210> 291

<400> 291
000

<210> 292

<400> 292
000

<210> 293

<400> 293
000

<210> 294

<400> 294
000

<210> 295

<400> 295
000

<210> 296
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H40 (PN)

<400> 296
ggatgtccac cttgtcccgc gaattct

<210> 297
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H40 (AA)

<400> 297

Gly Cys Pro Pro Cys Pro Ala Asn Ser
1 5

<210> 298

<400> 298
000

<210> 299
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> misc_feature
<223> Vinculador H41

<400> 299

Gly Cys Pro Pro Cys Pro Ala Asn Ser
1 5

<210> 300

<400> 300
000

<210> 301
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H42(AA)

<400> 301

Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser
1 5

<210> 302

<400> 302
000

<210> 303

<400> 303
000

<210> 304
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H44 (PN)

<400> 304
ggaggagcta gttgtccacc ttgtcccggg aattct 36

<210> 305
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H44 (AA)

<400> 305

Gly Gly Ala Ser Cys Pro Pro Cys Pro Gly Asn Ser
1 5 10

<210> 306
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H45 (PN)

<400> 306
ggaggagcca gttgtccacc ttgtgccggg aattct 36

<210> 307
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H45 (AA)

<400> 307

Gly Gly Ala Ser Cys Pro Pro Cys Ala Gly Asn Ser
1 5 10

<210> 308
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<220>
<223> Vinculador H46

<400> 308
ggaggagcca gttgtccacc ttgtgcgaat tct 33

<210> 309
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H46

<400> 309
Gly Gly Ala Ser Cys Pro Pro Cys Ala Asn Ser
1 5 10

<210> 310
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H47

<400> 310

Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Leu Thr Pro Ser Ile Gly Asn Ser
1 5 10 15

<210> 311
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H48

<400> 311

Lys Ala Asp Phe Leu Thr Pro Ser Ile Gly Asn Ser
1 5 10

<210> 312

<400> 312
000

<210> 313
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H50

<400> 313

Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Gly Asn Ser
1 5 10 15

<210> 314
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H51

<400> 314

Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Gly Asn Ser
1 5 10 15

<210> 315
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H52

<400> 315

Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ser
1 5 10

<210> 316
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H53

<400> 316

Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser
1 5 10 15

<210> 317
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H54

<400> 317

Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Ser Cys Pro Pro Cys
1 5 10 15

Pro Asn Ser

<210> 318
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H55

<400> 318

Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Ser
1 5 10 15

<210> 319
<211> 12
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H56

<400> 319

Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Ser
1 5 10

<210> 320
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H57

<400> 320

Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro Asn Ser
1 5 10

<210> 321
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H58

<400> 321

Lys Pro Phe Phe Thr Cys Gly Ser Ala Asp Thr Cys Pro Asn Ser
1 5 10 15

<210> 322
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H59

<400> 322

Lys Pro Phe Phe Thr Cys Gly Ser Ala Asp Thr Cys Pro Asn Ser
1 5 10 15

<210> 323
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H60

<400> 323

Gln Tyr Asn Cys Pro Gly Gln Tyr Thr Phe Ser Met Asn Ser
1 5 10

<210> 324
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H61

<400> 324

Glu Pro Ala Phe Thr Pro Gly Pro Asn Ile Glu Leu Gln Lys Asp Ser
1 5 10 15

Asp Cys Pro Asn Ser
20

<210> 325
<211> 21
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H62

<400> 325

Gln Arg His Asn Asn Ser Ser Leu Asn Thr Arg Thr Gln Lys Ala Arg
1 5 10 15

His Cys Pro Asn Ser
20

<210> 326
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H63

<400> 326

Asn Ser Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr
1 5 10 15

Cys Asn Ser

<210> 327
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 327

Gln Arg His Asn Asn Ser Ser Leu Asn Thr Arg Thr Gln Lys Ala Arg
1 5 10 15

His Cys Pro Asn Ser
20

<210> 328
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H65

<400> 328

Glu Pro Ala Phe Thr Pro Gly Pro Asn Ile Glu Leu Gln Lys Asp Ser
1 5 10 15

Asp Cys Pro Asn Ser
20

<210> 329
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H66

<400> 329

Glu Pro Ala Phe Thr Pro Gly Pro Asn Ile Glu Leu Gln Lys Asp Ser
1 5 10 15

Asp Cys Pro Asn Ser
20

<210> 330
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H67

<400> 330

Glu Pro Ala Phe Thr Pro Gly Pro Asn Ile Glu Leu Gln Lys Asp Ser
1 5 10 15

Asp Cys Pro Asn Ser
20

<210> 331
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Vinculador H68

<400> 331

Arg Thr Arg Tyr Leu Gln Val Ser Gln Gln Leu Gln Gln Thr Asn Arg
1 5 10 15

Val Leu Glu Val Thr Asn Ser Ser Leu Arg Gln Gln Leu Arg Leu Lys
20 25 30

Ile Thr Gln Leu Gly Gln Ser Ala Glu Asp Leu Gln Gly Ser Arg Arg
35 40 45

Glu Leu Ala Gln Ala Gln Glu Ala Leu Gln Val Glu Gln Arg Ala His
50 55 60

Gln Ala Ala Glu Gly Gln Leu Gln Ala Cys Gln Ala Asp Arg Gln Lys
65 70 75 80

Thr Lys Glu Thr Leu Gln Ser Glu Glu Gln Gln Arg Arg Ala Leu Glu
85 90 95

Gln Lys Leu Ser Asn Met Glu Asn Arg Leu Lys Pro Phe Phe Thr Cys

100 105 110

Gly Ser Ala Asp Thr Cys
115

<210> 332
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> anti-CD-20 VL CDR1

<400> 332

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 333
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> anti-CD-20 VL CDR1

<400> 333

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile Val
1 5 10

<210> 334
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> anti-CD-20 VL CDR3

<400> 334

Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 335
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> anti-CD-20 VL CDR3

<400> 335

Gln Gln Tyr Ser Phe Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 336
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> anti-CD-20 VH CDR2

<400> 336

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 337
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> anti-CD-20 VH CDR2

<400> 337

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Glu Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 338
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> anti-CD20 VH CDR3

<400> 338

Ser Val Tyr Tyr Ser Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 339
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> anti-CD20 VH CDR3

<400> 339

Ser Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 340
<211> 12
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> anti-CD20 VH CDR3

<400> 340

Ser Tyr Tyr Ser Asn Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 341
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> anti-CD20 VH CDR3

<400> 341

Ser Tyr Tyr Ser Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 342
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> anti-CD20 VH CDR3

<400> 342

Ser Tyr Lys Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 343
<211> 12
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> anti-CD20 VH CDR3

<400> 343

Ser Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 344
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> anti-CD-20 VH CDR3

<400> 344

Ser Tyr Lys Ser Asn Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 345
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> anti-CD20 VH CDR3

<400> 345

Ser Tyr Lys Ser Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 346
<211> 8
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Escorpión Vinculador core (2H7) sequence

<400> 346

Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser
1 5

<210> 347
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Extension sequence

<400> 347

Ala Pro Glu Leu
1

<210> 348
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Extension sequence

<400> 348

Ala Pro Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 349
<211> 14
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Extension sequence

<400> 349

Ala Pro Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 350
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Extension sequence

<400> 350

Ala Pro Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ser

<210> 351
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Extended Escorpión Vinculador

<400> 351

Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser Ala Pro Glu Leu
1 5 10

<210> 352
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Extended Escorpión Vinculador

<400> 352

Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser Ala Pro Glu Leu Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser

<210> 353
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Extended Escorpión Vinculador

<400> 353

Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser Ala Pro Glu Leu Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20

<210> 354
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Extended Escorpión Vinculador

<400> 354

Gly Cys Pro Pro Cys Pro Asn Ser Ala Pro Glu Leu Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 355
<211> 51
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> VL CDR1-X-VL CDR3-X- VH CDR2-X-VH CDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR1 and VL CDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR3 and VH CDR2

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa = a range of amino acids between VH CDR2 and VH CDR3

<400> 355

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Xaa Gln Gln Trp Ser Phe
1 5 10 15

Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Val Tyr Tyr Ser Asn Tyr Trp Tyr
35 40 45

Phe Asp Leu
50

<210> 356
<211> 51
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR1 and VL CDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR3 and VH CDR2

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa = a range of amino acids between VH CDR2 and VH CDR3

<400> 356

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Xaa Gln Gln Trp Ser Phe
1 5 10 15

Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Trp Tyr
35 40 45

Phe Asp Leu
50

<210> 357
<211> 51
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR1 and VL CDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR3 and VH CDR2

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa = a range of amino acids between VH CDR2 and VH CDR3

<400> 357

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Xaa Gln Gln Trp Ser Phe
1 5 10 15

Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Tyr Tyr Ser Asn Ser Asp Trp Tyr
35 40 45

Phe Asp Leu
50

<210> 358
<211> 51
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR1 and VL CDR3

<220>

<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR3 and VH CDR2

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa = a range of amino acids between VH CDR2 and VH CDR3

<400> 358

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Xaa Gln Gln Trp Ser Phe
1 5 10 15

Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Tyr Tyr Ser Gly Gly Asp Trp Tyr
35 40 45

Phe Asp Leu
50

<210> 359
<211> 51
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR1 and VL CDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR3 and VH CDR2

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa = a range of amino acids between VH CDR2 and VH CDR3

<400> 359

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile Val Xaa Gln Gln Trp Ser Phe
1 5 10 15

Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Tyr Lys Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr
35 40 45

Phe Asp Leu
50

<210> 360
<211> 51
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR1 and VL CDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR3 and VH CDR2

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa = a range of amino acids between VH CDR2 and VH CDR3

<400> 360

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile Val Xaa Gln Gln Trp Ser Phe
1 5 10 15

Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Glu Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr
35 40 45

Phe Asp Leu
50

<210> 361
<211> 51
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR1 and VL CDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR3 and VH CDR2

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa = a range of amino acids between VH CDR2 and VH CDR3

<400> 361

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile Val Xaa Gln Gln Tyr Ser Phe
1 5 10 15

Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr
35 40 45

Phe Asp Leu
50

<210> 362
<211> 51
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR1 and VL CDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR3 and VH CDR2

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa = a range of amino acids between VH CDR2 and VH CDR3

<400> 362

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Xaa Gln Gln Trp Ser Phe
1 5 10 15

Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Tyr Lys Ser Asn Ser Asp Trp Tyr
35 40 45

Phe Asp Leu
50

<210> 363
<211> 51
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR1 and VL CDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR3 and VH CDR2

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa = a range of amino acids between VH CDR2 and VH CDR3

<400> 363

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Xaa Gln Gln Trp Ser Phe
1 5 10 15

Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Glu Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Tyr Tyr Ser Asn Ser Asp Trp Tyr
35 40 45

Phe Asp Leu
50

<210> 364
<211> 51
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR1 and VL CDR3

<220>

<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR3 and VH CDR2

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa = a range of amino acids between VH CDR2 and VH CDR3

<400> 364

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Xaa Gln Gln Tyr Ser Phe
1 5 10 15

Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Tyr Tyr Ser Asn Ser Asp Trp Tyr
35 40 45

Phe Asp Leu
50

<210> 365
<211> 51
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> VLCDR1-X-VLCDR3-X- VHCDR2-X-VHCDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR1 and VL CDR3

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Xaa = a range of amino acids between VL CDR3 and VH CDR2

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa = a range of amino acids between VH CDR2 and VH CDR3

<400> 365

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Xaa Gln Gln Tyr Ser Phe
1 5 10 15

Asn Pro Pro Thr Xaa Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Glu Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Xaa Ser Tyr Lys Ser Gly Gly Asp Trp Tyr
35 40 45

Phe Asp Leu
50

<210> 366
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> partial CH3 sequence

<400> 366

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
1 5 10

<210> 367
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Partial CH3 sequence

<400> 367

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5

<210> 368
<211> 1
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Partial CH3 sequence

<400> 368

Gln
1

<210> 369
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Partial CH3 sequence

<400> 369

Gln Lys Ser
1

<210> 370
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Partial CH3 sequence

<400> 370

Gln Lys Ser Leu Ser Leu
1 5

<210> 371
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Partial CH3 sequence

<400> 371

Gln Lys Ser Leu Ser
1 5

<210> 372
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Escorpión Vinculador

<400> 372

Gly Cys Pro Pro Cys
1 5

<210> 373
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Escorpión Vinculador

<400> 373

Gln Tyr Asn Cys Pro Gly Gln Tyr Thr Phe Ser Met
1 5 10

<210> 374
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Escorpión Vinculador

<400> 374

Pro Phe Phe Thr Cys Gly Ser Ala Asp Thr Cys
1 5 10

<210> 375
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Escorpión Vinculador

<400> 375

Glu Pro Ala Phe Thr Pro Gly Pro Asn Ile Glu Leu Gln Lys Asp Ser
1 5 10 15

Asp Cys

<210> 376
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Escorpión Vinculador

<400> 376

Gln Arg His Asn Asn Ser Ser Leu Asn Thr Arg Thr Gln Lys Ala Arg
1 5 10 15

His Cys

<210> 377
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> Escorpión Vinculador

<400> 377

Asn Ser Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr
1 5 10 15

Cys

<210> 378
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<223> anti-CD20 VL CDR1 (TRU-015)

<400> 378

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 379
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>
<223> anti-CD20 VH CDR3 (TRU-015)

<400> 379

Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/071052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00 A61P31/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/076489 A (MEDINNOVA AS [NO]; BOGEN BJARNE [NO]; FREDRIKSEN AGNETE BRUNSVIK [NO];) 10 September 2004 (2004-09-10) page 17 - page 29 claims 78-81 page 13, line 3 - line 14	1-3, 49-52, 56,59-71
Y	----- -/--	88

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 January 2008	17/04/2008

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bumb, Peter

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

675

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/071052

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	COLOMA M J ET AL: "DESIGN AND PRODUCTION OF NOVEL TETRAVALENT BISPECIFIC ANTIBODIES" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 15, no. 2, 1 February 1997 (1997-02-01), pages 159-163, XP000647731 ISSN: 1087-0156 the whole document	1-3, 49-52, 56, 59-67,71
Y		88
X	US 2006/104971 A1 (GARBER ELLEN [US] ET AL) 18 May 2006 (2006-05-18) examples 1-6,9 figures 9,10 paragraphs [0076] - [0078]	1-3, 49-52, 56, 59-67,71
Y		88
X	US 2005/158829 A1 (FANDL JAMES P [US] ET AL) 21 July 2005 (2005-07-21) examples 3,4	1-3, 49-52, 56, 59-67,71
Y		88
X	WO 03/074569 A (IMMUNOMEDICS INC [US]; MCCALL JOHN DOUGLAS [GB]) 12 September 2003 (2003-09-12) page 40 - page 46	1-3, 49-52, 56, 59-67,71
Y		88
X	WO 2005/000899 A (BIOGEN IDEC INC [US]; GLASER SCOTT [US]; REFF MITCHELL [US]; YANG TZUN) 6 January 2005 (2005-01-06) figures 4,7 examples 8-10 page 47, lines 5-7	1-3, 49-52, 56, 59-67,71
Y		88
A	WO 2005/017148 A (TRUBION PHARMACEUTICALS INC [US]; LEDBETTER JEFFREY A [US]; HAYDEN-LED) 24 February 2005 (2005-02-24) the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/071052

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 60-70, 86, 88 (of invention 1)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [X] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1, 49 - 52, 56, 59 - 71, 86, 88 (in part), 2 - 3 (complete)

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 60-70, 86, 88 (of invention 1) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 60-70, 86, 88 (of invention 1)

Although claims 60-70, 86, 88 (of invention 1) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 2-3 (complete)

   AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 comprises VH+VL of an immunoglobulin; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

   ---

2. claims: 1, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 4-5 (complete)

   AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB2 comprises VH+VL of an immunoglobulin; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

   ---

3. claims: 1, 9, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 6-7 (complete)

   AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 and AB2 recognize the same molecular target or epitope, i.e. on the same cell or on two distinct cells; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

   ---

4. claims: 1, 9, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 8, 10 (complete)

   AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 and AB2 recognize two different molecular targets on the same or different cells/virii/carriers/objects; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

   ---

5. claims: 1, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 11 (complete)

   AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1, CHX and AB2 are derived from a human Ig; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

   ---

6. claims: 1, 12-13, 28-30, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 14 (complete)

   AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize a tumour antigen, i.e. those mentioned in claim 14, or i.e. Prostate Specific Membrane Antigen mentioned in claim 28; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

   ---

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

7. claims: 1, 12-13, 29-30, 32, 49-52, 56-57, 59-71, 86, 88 (in part), 15, 31, 33, 72-83, 87, 89
(complete)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize a B-cell target, i.e. those mentioned in claims 15, 31, 72, or i.e. wherein AB1 or AB2 comprise anti-CD20 or anti-CD37 amino acid sequences SEQ ID Nos: 2, 103, 105, 332-345, 355-365; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production, i.e. comprising SEQ ID NO: 1; methods of treatment making use thereof

---

8. claims: 1, 12-13, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 16
(complete)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize a TNF-R superfamily member, i.e. those mentioned in claim 16; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

9. claims: 1, 12-13, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 17
(complete)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize a Hedgehog family member, i.e. those mentioned in claim 17; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

10. claims: 1, 12-13, 28, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 18
(complete)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize a receptor tyrosine kinase member, i.e. those mentioned in claim 18; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

11. claims: 1, 12-13, 28, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 19
(complete)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize a proteoglycan related molecule, i.e. those mentioned in claim 19 or Receptor for Advanced Glycation End products mentioned in claim 28; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

12. claims: 1, 12-13, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 20
(complete)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize a TGF-superfamily member, i.e. those mentioned in claim 20; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

13. claims: 1, 12-13, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 21 (complete)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize a Wnt-related molecule, i.e. those mentioned in claim 21; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

14. claims: 1, 12-13, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 22 (complete)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize a receptor ligand, i.e. those mentioned in claim 22 or IL-17A, IL-17F, P19, Dickkopf-1, IL-21, IL-4, Myostatin mentioned in claim 28; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

15. claims: 1, 12-13, 29-30, 32, 49-52, 57, 59-71, 86, 88 (in part), 23 (complete)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize a T cell target, i.e. the TCR mentioned in claim 23 or the anti-CD3 or anti-CD28 amino acid sequences SEQ ID ID Nos: 4, 6, 107, 109; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production, i.e. comprising SEQ ID NO: 3 or 5; methods of treatment making use thereof

---

16. claims: 1, 12-13, 29-30, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 24 (complete)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize an NK cell target, i.e.those mentioned in claim 24; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

17. claims: 1, 12-13, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 25 (complete)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize an monocyte/macrophage cell receptor, i.e. those mentioned in claim 25; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

18. claims: 1, 12-13, 29-30, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 26 (complete)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize an Dendritic cell receptor, i.e. those mentioned in claim 26; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

19. claims: 1, 12-13, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 27 (complete)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize an angiogenesis target, i.e. those mentioned in claim 27; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

20. claims: 1, 28, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize NOTCH1; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

21. claims: 1, 28, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize IgHE; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

22. claims: 1, 28, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize IL-22R; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

23. claims: 1, 28, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize Amyloid oligomer or Amyloid Precursor Protein; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

24. claims: 1, 28, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize NOGO receptor; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

25. claims: 1, 28, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize Low density Lipoprotein Receptor - Related Protein 5; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

26. claims: 1, 28, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 or AB2 recognize Very Late Antigen 4; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

27. claims: 1, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 34-36 (complete)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein CHX recognizes an Fc receptor, CD16, CD32a, CD64, CD89, Fc R1, FcRn or pIgR or has a CH2 + CH3 domain; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

28. claims: 1, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 37 (complete)

AB1-CHX-L2-AB2, comprising CH2 and truncated CH3, wherein CH3 ends in SEQ ID Nos: 366-371; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

29. claims: 1, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 38-40 (complete)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein L2 is derived from an immunoglobulin hinge, i.e. comprising SEQ ID Nos: 351-354 (see Table 10); related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

30. claims: 1, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 41 (complete)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein L2 is derived from a C-lectin stalk, i.e. comprising SEQ ID Nos: 373-377 (see Table 13); related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

31. claims: 1, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 44, 58 (complete)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein a linker L1 >5aa is inserted between AB1 and CHX; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

---

32. claims: 1, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 45, 46 (complete)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein AB1 and AB2 have a binding affinity less than 10 -9 M or greater than 10 -6 M; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

33. claims: 1, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 47 (complete)

AB1-CHX-L2-AB2, wherein Chx has CDC- or ADCC-function; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

34. claims: 1, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 48 (complete)

AB1-CHX-L2-AB2, which has an in vivo half-life of >28 hours in a human; related nucleotides, vectors, host cells and methods of production; methods of treatment making use thereof

---

35. claims: Claims 53-55 (complete)

A method for producing a protein AB1-CHX-L2-AB2, by expressing it from a host-cell at a level of > 1 mg/ml

---

36. claims: Claims 84-85 (complete)

A method for identifying AB1 or AB2 comprising, contacting at least one antigen with two antibodies having two different specificities, contacting said two antibodies with an anti-isotye secondary antibody and measuring activity of the target-antigen

---

37. claims: Claims 90-98 (complete)

Compositions comprising and methods using a plurality of multivalent single-chain binding proteins.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2007/071052

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004076489 A	10-09-2004	AU 2004215489 A1	10-09-2004
		CA 2517054 A1	10-09-2004
		EP 1599504 A1	30-11-2005
		US 2004253238 A1	16-12-2004
US 2006104971 A1	18-05-2006	NONE	
US 2005158829 A1	21-07-2005	NONE	
WO 03074569 A	12-09-2003	AU 2003209446 A1	16-09-2003
		CA 2478011 A1	12-09-2003
		EP 1487879 A2	22-12-2004
		JP 2006502091 T	19-01-2006
WO 2005000899 A	06-01-2005	AU 2004252170 A1	06-01-2005
		AU 2004252171 A1	06-01-2005
		CA 2529945 A1	06-01-2005
		CA 2530388 A1	06-01-2005
		EP 1641826 A2	05-04-2006
		EP 1641827 A2	05-04-2006
		JP 2007535296 T	06-12-2007
		JP 2007535297 T	06-12-2007
		WO 2005000898 A2	06-01-2005
WO 2005017148 A	24-02-2005	AU 2003300092 A1	07-03-2005
		BR PI0318417 A	25-07-2006
		CA 2533921 A1	24-02-2005
		CN 1852976 A	25-10-2006
		EP 1654358 A1	10-05-2006
		HR 20060074 A2	31-08-2006
		IS 8305 A	16-02-2006
		JP 2007528194 T	11-10-2007
		KR 20060070530 A	23-06-2006
		US 2007237779 A1	11-10-2007

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
21 December 2007 (21.12.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/146968 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 14/435 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2007/071052

(22) International Filing Date: 12 June 2007 (12.06.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/813,261	12 June 2006 (12.06.2006)	US
60/853,287	20 October 2006 (20.10.2006)	US

(71) Applicant: **TRUBION PHARMACEUTICALS** [US/US]; 2401 Fourth Avenue, Suite 1050, Seattle, WA 98121 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **THOMPSON, Peter, Armstrong** [US/US]; 14075 30th Place N.E., Bellevue, WA 98007 (US). **LEDBETTER, Jeffrey, A.** [US/US]; 18798 Ridgefield Road NW, Shoreline, WA 98177 (US). **HAYDEN-LEDBETTER, Martha, Susan** [US/US]; 18798 Ridgefield Road NW, Shoreline, WA 98178 (US). **GROSMAIRE, Laura, Sue** [US/US]; 19909 280th Avenue, SE, Hobart, WA 98025 (US). **BADER, Robert** [US/US]; 1411 Boylston Avenue, Apt. #314, Seattle, WA 98122 (US). **BRADY, William** [US/US]; 618 219th Place SW, Bothell, WA 98021 (US). **TCHISTIAKOVA, Lioudmila** [CA/US]; 19 Abbot Bridge Drive, Andover, MA 01810 (US). **FOLLETTIE, Maximillian, T.** [US/US]; 12 Greenbrook Way, Belmont, MA 02478 (US). **CALABRO, Valerie** [FR/US]; 195 Binney Street #1205, Cambridge, MA 02142 (US). **SCHULER, Alwin** [NL/US]; 2 Centennial Street, Hopedale, MA 01747 (US).

(74) Agent: **MERKEL, William, K.**; Marshall, Gerstein & Borun LLP, 233 S. Wacker Drive, Suite 6300, Sears Tower, Chicago, IL 60606-6357 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

— *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: SINGLE-CHAIN MULTIVALENT BINDING PROTEINS WITH EFFECTOR FUNCTION

(57) Abstract: Multivalent binding peptides, including bi-specific binding peptides, having immunoglobulin effector function are provided, along with encoding nucleic acids, vectors and host cells as well as methods for making such peptides and methods for using such peptides to treat or prevent a variety of diseases, disorders or conditions, as well as to ameliorate at least one symptom associated with such a disease, disorder or condition.

WO 2007/146968 A2

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2007/071052	12.06.2007	12.06.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00 A61P31/00

Applicant
TRUBION PHARMACEUTICALS

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V *Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement*
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notifed the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:	Date of completion of this opinion	Authorized Officer
European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	*see form* PCT/ISA/210	Bumb, Peter Telephone No. +31 70 340-8936

Form (PCT/ISA/237) (Cover Sheet) (April 2005)

687

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2007/071052

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed

   ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

   a. type of material:

      ☒ a sequence listing

      ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material:

      ☒ on paper

      ☒ in electronic form

   c. time of filing/furnishing:

      ☒ contained in the international application as filed.

      ☐ filed together with the international application in electronic form.

      ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

4. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

688

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 60-70, 86, 88 (of invention 1)

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 60-70, 86, 88 (of invention 1) relate to the following subject matter which does not require an international search *(specify)*:

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13*ter*.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:

   ☐ paid additional fees

   ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee

   ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid

   ☒ not paid additional fees

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is

   ☐ complied with

   ☒ not complied with for the following reasons:

   see separate sheet

4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:

   ☐ all parts.

   ☒ the parts relating to claims Nos. 1, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 2-3 (complete) (invention 1)

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	86, 88
	No:	Claims	1-3, 49-52, 56, 59-71
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-3, 49-52, 56, 59-71, 86, 88
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-3, 49-52, 56, 59-71, 86, 88
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

690

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

691

Reference is made to the following documents:

D1: WO 2004/076489 A (MEDINNOVA AS [NO]; BOGEN BJARNE [NO]; FREDRIKSEN AGNETE BRUNSVIK [NO];) 10 September 2004 (2004-09-10)

D2: COLOMA M J ET AL: "DESIGN AND PRODUCTION OF NOVEL TETRAVALENT BISPECIFIC ANTIBODIES" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 15, no. 2, 1 February 1997 (1997-02-01), pages 159-163, XP000647731 ISSN: 1087-0156

D3: US 2006/104971 A1 (GARBER ELLEN [US] ET AL) 18 May 2006 (2006-05-18)

Re Item I

Basis of the report

Since only a single search fee has been provided the underlying report is based on the invention first mentioned in the claims, in other words: invention 1 (*claims 1, 49-52, 56, 59-71, 86, 88 (in part), 2-3 (complete)*)

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

III.1 Claims 60-70, 86, 88 (of invention 1) relate to a subject-matter considered by this Authority to be covered by the provision of Rule 39.1(iv)/67.1(iv) PCT.

Re Item IV

Lack of unity of invention

IV.1 The underlying application relates to multivalent single-chain binding proteins comprising **(a)** a first and **(d)** a second Ig-derive binding domain (**AB1**, **AB2**), wherein the term 'binding domain' encompasses VH and VL regions (see description; p. 4, l. 8), **(b)** an Ig-derived constant/effector region C-terminal to (a) (**CH_x**), **(c)** a so-called "scorpion-linker" C-terminal to (b) (**L2**), leading to the general structure:

602

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

MERKEL, William, K.
Marshall, Gerstein & Borun LLP
233 S. Wacker Drive, Suite 6300
Sears Tower
Chicago, IL 60606-6357
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 21 August 2007 (21.08.2007)	
Applicant's or agent's file reference 30906/41393C/PC	**IMPORTANT NOTIFICATION**
International application No. PCT/US2007/071052	International filing date *(day/month/year)* 12 June 2007 (12.06.2007)
International publication date *(day/month/year)* **Not yet published**	Priority date *(day/month/year)* 12 June 2006 (12.06.2006)
Applicant TRUBION PHARMACEUTICALS et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. *(If applicable)* The **letters "NR"** appearing in the right-hand column denote **a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau** under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. *(If applicable)***An asterisk (*)** appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes **a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b)** (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
12 June 2006 (12.06.2006)	60/813,261	US	08 August 2007 (08.08.2007)
20 October 2006 (20.10.2006)	60/853,287	US	08 August 2007 (08.08.2007)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Masashi Honda
Facsimile No. +41 22 338 82 70
Telephone No. +41 22 338 74 08

692

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

MERKEL, William, K.
Marshall, Gerstein & Borun LLP
233 S. Wacker Drive, Suite 6300
Sears Tower
Chicago, IL 60606-6357
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
12 February 2008 (12.02.2008)

Applicant's or agent's file reference
30906/41393C/PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2007/071052

International filing date *(day/month/year)*
12 June 2007 (12.06.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
TRUBION PHARMACEUTICALS
2401 Fourth Avenue, Suite 1050
Seattle, WA 98121
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
Teleprinter No.:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
TRUBION PHARMACEUTICALS, INC.
2401 Fourth Avenue, Suite 1050
Seattle, WA 98121
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
Teleprinter No.:

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☒ the International Searching Authority
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 70 10

Authorized officer
Chevallay-Worley Madeleine
e-mail pt08.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 08

623

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

MERKEL, William, K.
Marshall, Gerstein & Borun LLP
233 S. Wacker Drive, Suite 6300
Sears Tower
Chicago, IL 60606-6357
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
23 January 2008 (23.01.2008)

Applicant's or agent's file reference
30906/41393C/PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2007/071052

International filing date *(day/month/year)*
12 June 2007 (12.06.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
Wyeth
5 Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940
United States of America

State of Nationality: US | State of Residence: US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for all designated States except the United States of America.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☒ the International Searching Authority
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 70 10

Authorized officer
Warsi Naim
e-mail pt08.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 08

Form PCT/IB/306 (October 2005) I/DI5UYPFY0

694

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

MERKEL, William, K.
Marshall, Gerstein & Borun LLP
233 S. Wacker Drive, Suite 6300
Sears Tower
Chicago, IL 60606-6357
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
23 January 2008 (23.01.2008)

Applicant's or agent's file reference
30906/41393C/PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2007/071052

International filing date *(day/month/year)*
12 June 2007 (12.06.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
TRUBION PHARMACEUTICALS
2401 Fourth Avenue, Suite 1050
Seattle, WA 98121
United States of America

State of Nationality: US | State of Residence: US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 is now recorded as applicant for all designated States except the United States of America.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☒ the International Searching Authority
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 70 10

Authorized officer
Warsi Naim
e-mail pt08.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 08

GAS

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
21 December 2007 (21.12.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/146968 A3

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2007/071052

(22) International Filing Date: 12 June 2007 (12.06.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/813,261 12 June 2006 (12.06.2006) US
60/853,287 20 October 2006 (20.10.2006) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **TRUBION PHARMACEUTICALS, INC.** [US/US]; 2401 Fourth Avenue, Suite 1050, Seattle, WA 98121 (US). **Wyeth** [US/US]; 5 Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **THOMPSON, Peter, Armstrong** [US/US]; 14075 30th Place N.E., Bellevue, WA 98007 (US). **LEDBETTER, Jeffrey, A.** [US/US]; 18798 Ridgefield Road NW, Shoreline, WA 98177 (US). **HAYDEN-LEDBETTER, Martha, Susan** [US/US]; 18798 Ridgefield Road NW, Shoreline, WA 98178 (US). **GROSMAIRE, Laura, Sue** [US/US]; 19909 280th Avenue, SE, Hobart, WA 98025 (US). **BADER, Robert** [US/US]; 1411 Boylston Avenue, Apt. #314, Seattle, WA 98122 (US). **BRADY, William** [US/US]; 618 219th Place SW, Bothell, WA 98021 (US). **TCHISTIAKOVA, Lioudmila** [CA/US]; 19 Abbot Bridge Drive, Andover, MA 01810 (US). **FOLLETTIE, Maximillian,** T. [US/US]; 12 Greenbrook Way, Belmont, MA 02478 (US). **CALABRO, Valerie** [FR/US]; 195 Binney Street #1205, Cambridge, MA 02142 (US). **SCHULER, Alwin** [NL/US]; 2 Centennial Street, Hopedale, MA 01747 (US).

(74) Agent: **MERKEL, William, K.**; Marshall, Gerstein & Borun LLP, 233 S. Wacker Drive, Suite 6300, Sears Tower, Chicago, IL 60606-6357 (US).

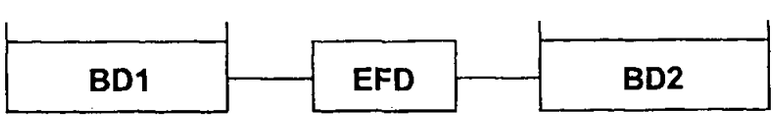
(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

(88) Date of publication of the international search report:
19 June 2008

(54) Title: SINGLE-CHAIN MULTIVALENT BINDING PROTEINS WITH EFFECTOR FUNCTION



(57) Abstract: Multivalent binding peptides, including bi-specific binding peptides, having immunoglobulin effector function are provided, along with encoding nucleic acids, vectors and host cells as well as methods for making such peptides and methods for using such peptides to treat or prevent a variety of diseases, disorders or conditions, as well as to ameliorate at least one symptom associated with such a disease, disorder or condition.

WO 2007/146968 A3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 08-133314- -00000-0000

Fecha: 2008-12-16 14:44:59 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 696

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION [✓] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [✓]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [✓]
- Descripción de la invención [✓]
- Dibujos de ser estos pertinentes [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [✓]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Claudia M Neva Cortes
Firma Responsable

Fecha_____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

697

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D` ALEMAN DILIA MARIA

REFERENCIA	Radicación No.	8 133314
	Solicitud internacional	PCT/US2007/071052
	Fecha inicio fase nacional	12/01/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	1035

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

Continua en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.:8 133314

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 30 ENE. 2009
jfernand

699